



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

INTERSEXUALIDADE CANINA

RADU ADRIAN MĂRGINEANU

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da Silva  
Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís  
Doutor Victor Manuel Diogo de Oliveira Alves

ORIENTADOR:

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luis

CO-ORIENTADOR:

Dra. Ana Catarina Mateus Murta

2015

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

INTERSEXUALIDADE CANINA

RADU ADRIAN MĂRGINEANU

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor José Manuel Antunes Ferreira da Silva  
Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís  
Doutor Victor Manuel Diogo de Oliveira Alves

ORIENTADOR:

Doutor José Paulo Pacheco Sales Luis

CO-ORIENTADOR:

Dra. Ana Catarina Mateus Murta

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Desejo agradecer a todos os que me apoiaram durante este meu percurso, em especial, ao meu orientador, Professor Doutor Sales Luis, agradecendo por ter aceitado orientar-me, pela capacidade distinta que tem para ensinar e pela ajuda na realização do presente estudo.

À minha co-orientadora, Dra Ana Murta, obrigada pela paciência que teve comigo e com a meu português, por me apresentar o mundo de cirurgia, por me ter apoiado durante os seis meses de estágio e pela ajuda no presente estudo.

À Professora Cristina Vilela, obrigada por tudo, sem si não estava aqui agora.

Ao Professor José F. Silva obrigado pela ajuda e pelos conhecimentos sobre o presente estudo.

A toda equipa do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária. Aos Médicos Veterinários, Enfermeiros, Auxiliares, Recepcionistas, obrigada por me ajudarem, aceitarem e ensinarem.

Aos todos meus colegas de estágio, Georgiana, Cláudia, Marta, Ana Isabel, Vânia, Daniela, Guadalupe, Ana, Carolina, Joana, Sofia, Catarina, e Radu, por serem uma equipa e por todos os momentos que partilhamos durante o estágio.

Desejo agradecer aos meus pais, por me apoiaram, por acreditarem em mim e pela paciência, e pela educação e por tudo que me oferecem.

Desejo agradecer à Georgiana, a minha namorada, por estar sempre ao meu lado e me amar, por acreditar em mim, por toda a ajuda que me deste e me acompanhares nesta viagem de vida, em Portugal.

Aos meus amigos do Portugal, Andreea, Irina, Sandra e Delfim, por fazer a distância de casa mais pequena, por estar ao meu lado e pelos momentos bonitos que tivemos juntos.

## **Resumo**

A intersexualidade é um distúrbio pouco frequente nos humanos, sendo hoje mais referido nos animais domésticos e silvestres. A intersexualidade é uma perturbação causada por anormalidades durante a determinação ou diferenciação sexual, resultando em defeitos do aparelho reprodutor. A intersexualidade pode ser classificada em 3 categorias: os distúrbios cromossómicos, os distúrbios de desenvolvimento gonadal e os distúrbios no desenvolvimento fenotípico.

Nos estudos recentes sobre intersexualidade, propunha-se a utilização de uma nova nomenclatura, DSD (Disorder of sex development), que engloba todos os casos em que o sexo cromossômico, desenvolvimento gonadal, ou de sexo anatómico é atípico.

O presente estudo inclui uma amostra de 5 casos, e tem o objectivo de caracterizar a amostra, analisar os resultados dos exames complementares realizados (o exame anatomo-histopatológico dos órgãos e a análise citogenética) e tentar classificar o tipo de intersexualidade encontrado.

Os resultados obtidos indicam que dos 5 casos, 3 eram hermafroditas verdadeiros e 2 casos eram pseudo hermafroditas masculinos.

Palavras-chave: intersexualidade, DSD, hermafroditas verdadeiros, pseudo hermafroditas masculinos.

## **Abstract**

Intersexuality is a relatively rare in humans, and it has being reported more frequently in animals domestic and wild. The intersexuality is caused by any anomaly that appears during sexual determination or differentiation, resulting in alterations of the reproductive system. The intersexuality can be classified in three main categories: sex chromosome disorders, disorders of gonadal sex development and disorders of phenotypic sex development.

In recent studies of intersexuality, there was used a new nomenclature DSD (Disorder of sex development), which includes all cases in which the chromosomal sex, gonadal development, or anatomical sex is atypical.

This study includes a sample of 5 cases, and aims to characterize and analyze the cases and the results of the complementary exams (the anatomohistopathological exam and cytogenetic analysis) and try to classify the type of intersexuality encountered.

The results are the following: 3 cases were true hermaphrodites and 2 cases were male pseudo hermaphrodites.

Keywords: intersexuality, DSD, true hermaphrodites, male pseudo hermaphrodites.

# Índice geral

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Índice geral .....	iv
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas .....	viii
Abreviaturas/Acrónimos .....	ix
Relatório do Estágio .....	1
I. Anatomia .....	2
A. O sistema reprodutor feminino .....	2
1. Ovários .....	2
2. As trompas uterinas .....	4
3. O útero .....	5
4. A vagina .....	6
5. O vestíbulo vaginal .....	6
6. A vulva, o clitóris .....	7
7. A uretra .....	7
8. A vascularização e os ligamentos largos .....	8
B. O aparelho reprodutor masculino .....	8
1. Escroto .....	9
2. Os testículos .....	10
Descida dos testículos .....	11
3. O epidídimo .....	12
4. O ducto deferente .....	12
5. O cordão espermático .....	13
6. A próstata .....	13
7. O pénis .....	14
8. O prepúcio .....	15
9. A uretra .....	15
II. GENÉTICA .....	16
A. Os cromossomas .....	16
B. ADN .....	17
C. A mitose e a meiose .....	18
1. A mitose .....	18

a) A profase .....	19
b) A prometafase e a metafase .....	19
c) A anafase .....	19
d) A telofase .....	20
2. A meiose .....	20
2.1. A primeira divisão meiótica .....	20
a) A profase I .....	20
b) A metafase I .....	21
c) A anafase I .....	22
d) A telofase I .....	22
2.2. A segunda divisão meiótica.....	22
a) A profase II .....	22
b) A metafase II .....	22
c) A anafase II .....	23
d) A telofase II .....	23
D. Erros durante a meiose .....	23
III. Embriologia .....	23
A. Biologia Molecular .....	29
IV. Intersexualidade Canina .....	34
A. Alterações cromossómicas.....	36
B. Distúrbios do desenvolvimento gonádico .....	38
C. Distúrbios no desenvolvimento fenotípico .....	39
1. Pseudo-hermafroditismo feminino.....	39
2. Pseudo-hermafroditismo masculino .....	40
a) A síndrome do ducto Mülleriano persistente .....	40
b) Os defeitos de masculinização androgénio – dependentes .....	40
D. Diagnóstico e tratamento .....	41
Piómetra .....	43
1. Técnica cirúrgica .....	44
2. Ovário - Histerectomia.....	44
a) Complicações cirúrgicas.....	46
3. Gonadectomia.....	47
❖ Orquiectomia .....	47
a) Castração pré-escrotal aberta .....	47
b) Castração pré-escrotal fechada .....	48
4. Amputação peniana .....	48
5. Amputação do clitóris .....	49
V. ESTUDO DOS CASOS CLINICOS.....	50



A. Introdução e objectivos.....	50
1. Introdução .....	50
2. Objectivos .....	50
B. Materiais e métodos .....	50
1. Amostra e Critérios de Inclusão .....	50
2. Técnicas envolvidas no diagnóstico .....	51
2.1. OVH.....	51
2.2. Exame histopatológico.....	51
2.3 Análise citogenética - bandeamento clássico G .....	51
C. Resultados .....	52
1. Caso 1 .....	52
2. Caso 2.....	55
3. Caso 3.....	57
4. Caso 4.....	61
5. Caso 5.....	64
D. Discussão.....	66
E. Conclusão .....	68
VI. Bibliografia .....	69

## Índice de figuras

Figura 1. Hipertrofia de clitóris-caso 1 .....	53
Figura 2. Útero - aspecto macroscópico-caso 1 .....	53
Figura 3. Gónadas- aspecto macroscópico-caso 1 .....	54
Figura 4. Aspecto microscópico-caso 1 .....	54
Figura 5. Útero- aspecto microscópico-caso 1 .....	55
Figura 6. Hipertrofia de clitóris-caso 2 .....	56
Figura 7. Gónadas- aspecto microscópico-caso 2 .....	56
Figura 8. Epidídimo-aspecto microscópico-caso 2 .....	56
Figura 9. Útero-aspecto microscópico-caso 2 .....	57
Figura 10. Hipertrofia de clitóris - caso 3 .....	58
Figura 11. Gónada 1 - exame microscópico - caso 3 .....	58
Figura 12. Gónada 1 - exame microscópico - caso 3 .....	59
Figura 13. Gónada 1 - exame microscópico - caso 3 .....	59
Figura 14. Gónada 2 - exame microscópico - caso 3 .....	60
Figura 15. Útero-aspecto microscópico-caso 3 .....	60
Figura 16. Exteriorização do pénis - caso 4 .....	62
Figura 17. Gónada esquerda - caso 4 .....	62
Figura 18. Gónada direita - caso 4 .....	63
Figura 19. O aspecto macroscópico dos órgãos genitais internos - caso 4 .....	63
Figura 20. O pénis - caso 4 .....	64
Figura 21. Exteriorização do pénis .....	65
Figura 22. As gónadas durante a cirurgia - caso 5 .....	65
Figura 23. O aspecto macroscópico dos órgãos genitais internos - caso 5 .....	66
Figura 24. O pénis e os órgãos genitais internos femininos - caso 5 .....	66

## **Índice de tabelas**

Tabela 1. As diferenças no desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino e masculino (McGeady et al., 2006).....	28
Tabela 2. As interações genéticas e celulares no desenvolvimento do aparelho reprodutor (McGeady et al., 2006). ....	33

## Abreviaturas/Acrónimos

°C	graus Celsius
2n	Número diplóide
A	Adenina
ADN	Àcido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BMP-4	Bone morphogenetic protein-4
C	Citosina
CAVO	Complexo Arteriovenoso Ovário
CGP	Células germinais primitivas
cm	Centímetros
Dax-1	Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1
DSD	Disorder of sex development
Hox	Genes heméóticos
kg	Quilograma
h	Horas
MIS	Hormona anti-mülleriana (Müllerian inhibiting substance)
MMPs	Metaloproteinases da matriz
SRX	Sex Determining Region of the Y Chromosome
PAX 2	Paired box gene 2
T	Tiamina
TIMPs	Inibidores de metaloproteinases

## **Relatório do Estágio**

O estágio curricular do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi efectuado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. O estágio foi realizado no período de 1 de Março de 2012 a 1 de Setembro de 2012, sendo de 6 meses e teve o total de 1488 horas, sendo a média por semana de 56 horas. O estágio foi realizado sob a orientação do Professor Sales Luis e co-orientação da Dra. Ana Murta.

Durante o período do estágio, tive a possibilidade de alternar entre as áreas de Cirurgia, Medicina Interna, Imagiologia e Internamento, sob a orientação de Médicos Veterinários. Particpei nas actividades clínicas de Medicina Interna e especialidades (Medicina Preventiva, Cardiologia, Dermatologia, Neurologia, Ortopedia, Gastroenterologia, Endocrinologia, Reprodução, Doenças Infecciosas e Parasitárias, Medicina dos Animais Exóticos e Urgências Médicas).

Durante o estágio, participei na área de cirurgia durante três meses. Neste serviço, tinha que alternar entre o papel de circulante, anestesista e cirurgião secundário. Tinha também o papel de preparar o animal para a cirurgia, realizar a intubação endotraqueal, realizar a tricotomia e assépsia do paciente, e preparar o material cirúrgico. Sob a orientação do cirurgião, foi-me permitido preencher as fichas de alta com a respectiva medicação pós-cirúrgica. Tive a responsabilidade de acompanhar as consultas pós-cirúrgicas, onde tinha que desinfetar as suturas, realizar pensos e tirar pontos. Foi-me permitido realizar suturas, orquiectomias nos cães e gatos, ovariectomia em gatas e destarizações.

Nos turnos de 24 horas, realizados no Internamento, tinha o papel de monitorizar e realizar os cuidados aos pacientes, preparar e administrar a medicação. Durante a noite, tinha o papel de ajudar o Médico Veterinário nas urgências. Também tinha que realizar os cuidados básicos de higiene, de alimentação e de fisioterapia. Realizei administração de fármacos, cateterização venosa, medição da pressão arterial e glicémia, colheita de amostras biológicas, tudo sob a supervisão do Médico Veterinário e de um Enfermeiro ou Auxiliar.

Na parte de Imagiologia, foi-me permitido participar nos estudos radiográficos (radiografias simples ou com contraste), nas ecografias, tomografias axiais computadorizadas e ajudar e monitorizar na anestesia quando foi preciso.

Na parte de Medicina Interna, foi-me permitido acompanhar as consultas, fazer a contenção dos animais para realizar os procedimentos médicos e desenvolver técnicas de comunicação com os proprietários sobre os resultados dos exames complementares, prognóstico e terapêutica. Realizei também preparação e administração de vacinas, colocação do microchip, cateterização venosa e ajudei na realização dos exames complementares de diagnóstico que fosse preciso.

O presente estudo, sobre Intersexualidade Canina, foi desenvolvido durante o período de estágio, tendo sido possível colher os resultados necessários, assistir às cirurgias dos pacientes da amostra, monitorizá-los e acompanhá-los nos períodos pré, intra e pós-cirúrgicos.

## **I. Anatomia**

Os sistemas reprodutores femininos e masculinos, embora embriologicamente tenham uma origem comum, apresentam variações na sua diferenciação (Dyce, 2010).

### **A. O sistema reprodutor feminino**

O sistema reprodutor feminino é formado por (Dyce, 2010):

- ovários ou gónadas femininas
- tubas uterinas
- útero (com cornos, corpo e cérvix)
- vagina
- vulva (com lábios, vestíbulo e clitóris)

#### **1. Ovários**

O ovário é um corpo maciço, elipsoidal, irregular devido à presença de corpos lúteos e dos folículos em várias fases de desenvolvimento. Existem em número par e localizam-se na parte dorsal do abdómen, posteriormente ao pólo caudal dos rins. O ovário está ligado a uma região dorsolateral do abdómen pelo mesovário, por onde passa a vascularização desse órgão. O mesovário continua-se cranialmente pelo ligamento suspensor do ovário e caudalmente pelo mesométrio (Stone, 2003).

Os ovários ou gónadas femininas produzem oócitos e hormonas esteróides (Dyce, 2010). Os oócitos são ovulados periodicamente. Eles entram no infundíbulo,

podendo ser fertilizados na trompa uterina, e depois transportados para o útero (Evans, de Lahunta, 2013).

O ovário encontra-se confinado numa bolsa ovárica. A parede da bolsa ovárica é formada em grande parte pelo mesovário distal (Evans, de Lahunta, 2013).

Na extremidade posterior da bolsa ovárica iniciam-se as trompas uterinas. Uma extremidade compreende o infundíbulo, enquanto que a outra, do lado do útero, prende-se a este com a ajuda do ligamento próprio do ovário (Dyce, 2010).

O ovário, além do mesovário, tem então mais 2 ligamentos:

- o ligamento suspensor
- o ligamento próprio do ovário que faz, a ligação entre o ovário e as trompas uterinas.

O ligamento suspensor inicia-se desde a parede abdominal, na porção dorsolateral, ao nível da última costela. Caudalmente fica preso ao ovário e a mesosalpinge, localizando-se entre a bolsa ovárica e a zona ascendente da trompa uterina (Dyce, 2010). Tanto o ligamento próprio, como o suspensor, são formados por tecido conjuntivo e fibras musculares lisas, sendo revertidos por mesotélio (Pasquini, Spurgeon, 1992).

O ovário é formado por medula e córtex. A medula contém nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras musculares lisas e tecido conjuntivo. O córtex, também chamado zona parenquimatosa, é delimitado por uma fina túnica albugínea externa. A túnica albugínea é coberta pelo peritoneu visceral, chamado epitélio superficial do ovário (Pasquini, Spurgeon, 1992). Assim, os folículos encontram-se abaixo da túnica albugínea (Evans, de Lahunta, 2013).

Cada folículo contém um oócito. Os folículos têm vários estádios de desenvolvimento (Dyce, 2010, Evans, de Lahunta, 2013, Songsasen, Wildt, 2007):

- primordial: folículo formado a partir de dia 17-54 após nascimento, oócito sem zona pelúcida (25 µm diâmetro)
- primário: pequeno folículo formado por volta de dia 120 após nascimento, oócito com zona pelúcida (75±15 µm diâmetro)
- secundário: oócitos totalmente desenvolvidos (>100 µm), rodeados por várias camadas de células foliculares
- terciário: a partir de dia 120-160 começa a síntese do líquido folicular que está no interior de uma cavidade, o antro folicular

- maduro: em uma extremidade da cavidade há o cumulus oophorus, que contém o oócito maduro. Em contato íntimo com o oócito está a zona pelúcida, que é rodeada pela coroa radiada (conjunto de células foliculares)
- em ovulação: quando o folículo rebenta, o ovócito é libertado na bolsa ovárica
- atrésico: a maioria dos folículos degeneram em diferentes fases de desenvolvimento ao longo da vida do animal

Quando o folículo liberta o respectivo oócito (ovulação), liberta-se também um líquido que se chama líquido folicular. Quando a cavidade de um folículo roturado fica preenchida, após a proliferação das células da granulosa e da teca interna, forma-se um corpo sólido, chamado corpo lúteo ou corpo amarelo. O tamanho deste varia conforme as etapas de estro e de metaestro. (Dyce, 2010, Evans, de Lahunta, 2013).

O corpo lúteo é uma estrutura transitória e representa uma importante fonte de progesterona, assim como os folículos maduros são uma fonte importante de estrogénio. Ocorre depois a degenerescência dos corpos lúteos, sendo substituídos por cicatrizes formadas por tecido conjuntivo, chamadas corpos brancos ou corpora albicantis (Dyce, 2010).

## **2. As trompas uterinas**

As trompas uterinas (ou oviductos) são estreitas e geralmente muito tortuosas, transportam os oócitos para o útero (Dyce, 2010). Elas são responsáveis também pelo transporte dos espermatozóides, resultando em que a fertilização produz nas trompas uterinas (Pasquini, Spurgeon, 1992). A extremidade cranial, livre, chama-se infundíbulo e tem forma de funil de parede delgada. O infundíbulo está localizado na proximidade do polo cranial do ovário (Pasquini, Spurgeon, 1992). A sua extremidade livre apresenta recortes, as fímbrias que, na altura da ovulação, apõem-se estreitamente à superfície do óvarios. Para além do infundíbulo, a trompa uterina divide-se em 2 segmentos (Dyce, 2010). O segmento proximal tem a denominação de ampola, enquanto que o segmento mais contorcido e estreito se chama istmo. O ápice do corno uterino une-se ao istmo e forma a junção útero-tubária (salpingouterina). As trompas uterinas têm a parede formada pela túnica serosa externa, túnica muscular média e túnica mucosa interna (Dyce, 2010, Aspinall, O'Reilly, 2004).



### 3. O útero

O útero é formado pelos cornos uterinos, que são compridos, delgados e retilíneos; pelo corpo uterino e também pelo cérvix. Os cornos uterinos unem-se caudalmente ao corpo uterino. O corpo uterino é curto, tendo 1,4 a 3 cm de comprimento e 0,8 a 1 cm no diâmetro. No útero produzem-se as trocas fisiológicas entre a mãe e o feto e é o lugar em que os embriões ficam em desenvolvimento durante a gestação (Evans, de Lahunta, 2013).

O cérvix encontra-se na cavidade pélvica entre o cólon descendente dorsalmente e a bexiga ventralmente e tem uma parede muito grossa (Dyce, 2010). O lúmen do cérvix ou canal cervical está coberto por pregas de mucosa, abrindo-se para o corpo uterino através de um óstio interno (Evans, de Lahunta, 2013).

Na zona cranial de cada um, o ligamento próprio faz a ligação do ovário com os cornos uterinos. O local em que os cornos uterinos se ligam às trompas uterinas chama-se óstio uterino. Na zona medial dos cornos, estes ligam-se um ao outro por meio da prega genital, que tem aproximadamente 1 cm, sendo esta uma estrutura triangular do peritoneu. O ligamento redondo do útero é ligado à ponta cranial do corno ipsilateral e, caudalmente, é uma continuação do ligamento próprio do ovário (Aspinall, O'Reilly, 2004).

O útero é formado por 3 camadas: a membrana serosa, muscular e mucosa. Estas têm a denominação de perimétrio, miométrio e endométrio (Pasquini, Spurgeon, 1992).

A túnica muscular, miométrio, é formada três camadas concêntricas: uma externa de músculo liso, uma média de tecido conjuntivo rico em vasos (estrato vascular) e uma interna, também de músculo liso. O endométrio é espesso e a sua superfície varia, em parte, para cada espécie. Esta é a mais espessa das 3 túnicas do útero e contém uma camada de células epiteliais que são periodicamente ciliadas (Dyce, 2010).

Na superfície do endométrio abrem-se múltiplas glândulas tubulosas, sendo estas muito compridas e ramificadas. As glândulas tubulosas atravessam toda a camada funcional do endométrio (Aspinall, O'Reilly, 2004).

A mucosa do interior do cérvix é moldada através da disposição alternada das pregas longitudinais e das circulares, sendo que as interdigitações auxiliam a fechar a passagem. Esta passagem fica aberta apenas durante o estro e um período muito curto depois do parto (Dyce, 2010).

O útero é innervado pelo plexo pélvico, tanto pelo simpático, como pelo parassimpático. As fibras aferentes que chegam ao útero provêm do plexo pélvico mas também dos nervos pélvicos (Pasquini, Spurgeon, 1992).

#### **4. A vagina**

Nas cadelas, a vagina é um canal relativamente comprido e dilatável, ultrapassando a margem cranial do púbis. A vagina está localizada entre o cérvix e a vulva (Predoi, Belu, 2001). O cérvix e a vagina, juntamente com o vestibulo, formam o canal através do qual se realiza o parto (o canal do parto) (Pasquini, Spurgeon, 1992).

Durante a gestação e o parto, tanto o comprimento, como o diâmetro da vagina aumentam. A vagina termina cranialmente à abertura uretral (Evans, de Lahunta, 2013).

A vagina apresenta pregas longitudinais, que são altas e permitem o aumento em diâmetro da mesma, mas apresenta também pregas transversais, mais pequenas, que se unem com as longitudinais e permitem o aumento em comprimento da vagina na porção craniocaudal (Evans, de Lahunta, 2013, Dyce, 2010).

O músculo vaginal é mais fraco que o uterino, mas tem uma disposição parecida com a deste (Evans, de Lahunta, 2013).

#### **5. O vestibulo vaginal**

O vestibulo vaginal é curto. Na submucosa deste encontram-se umas glândulas vestibulares pequenas. As paredes laterais integram os bulbos do vestibulo. Estes são desenvolvidos e têm um aspeto piriforme (Predoi, Belu, 2001).

O vestibulo vaginal localiza-se caudalmente ao arco isquiático e estende-se até ao orifício uretral externo da vulva (Aspinall, O'Reilly, 2004). As suas paredes são menos elásticas do que as da vagina.

As glândulas vestibulares são pequenas e numerosas e os seus ductos são rectilíneos. Estas glândulas produzem uma secreção mucosa, com papel de lubrificação durante o coito e o parto. Este muco contribui também para uma separação do útero em relação á vagina porque obstrui o canal na maioria das vezes (Dyce, 2010).

O orifício uretral abre-se na junção vagino-vestibular, através de uma papila, chamada papila uretral (Aspinall, O'Reilly, 2004). Este tubérculo estreita-se caudalmente e alarga-se cranialmente (Evans, de Lahunta, 2013).

## **6. A vulva, o clitóris**

A vulva, a uretra e o clitóris constituem os órgãos genitais externos (Evans, de Lahunta, 2013).

A vulva está localizada caudalmente em relação ao vestíbulo vaginal. É delimitada por duas pregas, chamadas lábios. A vulva tem forma triangular. Em todas as espécies, menos nas éguas, a comissura dorsal é arredondada, e a ventral é pontiaguda. Os lábios normalmente encontram-se fechados, para evitarem a propagação das infeções externas (Evans, de Lahunta, 2013). Durante o estro e o proestro, estes alargam (Aspinall, O'Reilly, 2004).

O clitóris está localizado na comissura ventral da vulva e é o homólogo do pénis do macho (Pasquini, Spurgeon, 1992). Está desenvolvido e estruturado sobre um substrato cartilágneo (Predoi, Belu, 2001).

O clitóris tem duas raízes, uma do lado direito e a outra do lado esquerdo, que se ligam ao arco isquiático. A glande é a única porção do clitóris que fica exposta ao exterior. A glande inclui uma fossa clitoridiana, encontrando-se cercada pelo prepúcio clitoridiano (Pasquini, Spurgeon, 1992). Portanto, o clitóris é formado por: (Evans, de Lahunta, 2013).

- 2 raízes (crura)
- o corpo do clitóris
- a glande do clitóris

## **7. A uretra**

A uretra atravessa de forma oblíqua a parede vaginal, ventral, abrindo-se numa papila uretral, nas cadelas, ventralmente à junção da vagina e do vestíbulo (Dyce, 2010). A submucosa uretral é muito vascularizada. A uretra é irrigada pela artéria vaginal e pelas artérias pudendas interna e externa. É forrada por uma membrana mucosa com pregas. A mucosa da uretra não tem glândulas. A musculatura da

uretra é formada por fibras musculares longitudinais no exterior e no interior também, encontrando-se as fibras circulares no meio (Evans, de Lahunta, 2013).

## **8. A vascularização e os ligamentos largos**

Os ligamentos largos têm um papel importante na anatomia do aparelho reprodutor, como principais ligamentos de fixação. Os ligamentos largos são bilaterais; a parte caudal insere-se no corpo do útero, no cérvix e na parte cranial da vagina, a parte cranial suspende o ovário, as trompas uterinas e o corno uterino (Dyce, 2010).

A saída pélvica é terminada por uma divisão musculofascial. O diafragma pélvico fecha a saída sobre o ânus e o diafragma urogenital fecha a saída sobre o vestíbulo (Evans, de Lahunta, 2013, Dyce, 2010).

A artéria ovárica ramifica-se desde a trompa uterina até à parte cranial do corno uterino. A artéria uterina é um ramo indireto da artéria ilíaca interna. As partes caudais do trato reprodutor são irrigadas pelas artérias pudendas internas e a artéria vaginal. As veias são satélites das artérias: a veia ovárica é maior do que a veia uterina (Dyce, 2010).

O plexo venoso é elaborado e proeminente na zona ventral do útero e na zona da vagina (Evans, de Lahunta, 2013, Dyce, 2010).

A inervação do sistema reprodutor é realizada através das fibras simpáticas, que se encontram no ovário, juntamente com a artéria ovárica, mas também por meio das fibras parassimpáticas, que chegam através do plexo pélvico. Estas fibras têm um papel importante na atividade uterina. Quando se produz a desinervação, interrompe-se a função ovárica, enquanto que o útero, mesmo assim, consegue coordenar as contrações de maneira que o parto possa ser normal (Dyce, 2010).

## **B. O aparelho reprodutor masculino**

Os órgãos genitais masculinos incluem: (Evans, de Lahunta, 2013).

- Testículos (estão incluídos em bolsas cutâneas, o escroto)
- Epidídimos
- Ductos deferentes (em parte do seu trajecto, estão incluídos no cordão espermático)
- Próstata
- Uretra

- Pénis

## 1. Escroto

O escroto é um pequeno saco de pele globular dividido por um septo mediano em duas partes, cada uma contendo um testículo, o epidídimo e a parte distal do ducto deferente. O septo escrotal é formado por todas as túnicas que formam o escroto, menos a pele. O escroto encontra-se a uma distância de 2/3 desde a abertura do prepúcio ao ânus (Evans, de Lahunta, 2013). O escroto situa-se a uma distância intermédia entre o períneo e a virilha. Nos cães, o escroto é pendular (Dyce, 2010).

No interior da pele, que forma a camada mais externa do escroto existe uma camada mal desenvolvida de músculo liso combinado com fibras elásticas e colagénicas que se designa túnica dartos (Evans, de Lahunta, 2013). A túnica dartos é portanto, uma camada fibromuscular que se estende como um septo entre os compartimentos que separam os testículos. No interior da túnica dartos fica a fáscia espermática (Dyce, 2010).

Depois de o peritoneu descer pelo anel inguinal profundo, este é coberto pela fáscia transversal, depois, ao sair do anel inguinal superficial, junta-se-lhe a fáscia abdominal profunda e a superficial. Estas fáscias combinadas formam a fáscia espermática que cobre o folheto parietal da túnica vaginal.

A túnica vaginal é, pois, uma invaginação do peritoneu. Aquela, juntamente com a fáscia espermática, cobre o testículo quando em posição escrotal e o cordão espermático (Evans, de Lahunta, 2013). O folheto parietal da túnica vaginal é separada do visceral por um espaço chamado canal vaginal, quando cobre o cordão espermático, e cavidade vaginal, quando envolve o testículo. O canal vaginal é contínuo com a cavidade peritoneal ao nível do anel vaginal.

O desenvolvimento da túnica vaginal no macho e do processo vaginal na fêmea são semelhantes.

O músculo cremáster forma-se desde a margem caudal do músculo oblíquo interno abdominal e insere-se na fáscia espermática da face parietal da túnica vaginal (Evans, de Lahunta, 2013).

## 2. Os testículos

O papel dos testículos é a produção de espermatozóides, de fluido para transportar estes dos testículos para o interior do aparelho reprodutor feminino e produção de testosterona (Aspinall, O'Reilly, 2004).

O testículo tem uma forma oval e localiza-se no interior do escroto. Em posição normal, tem uma disposição oblíqua dorso-caudal. O epidídimo encontra-se aderente dorsolateralmente à superfície do testículo, com o corpo na parte cranial e a cauda na extremidade caudal (Evans, de Lahunta, 2013). Mesmo que a sua posição inicial seja na cavidade abdominal, os testículos migram, nos primeiros dias de vida descendo através dos canais inguinais até ficarem dentro do escroto. Os testículos posicionam-se segundo o seu eixo horizontal (Dyce, 2010).

O testículo é envolvido por uma cápsula fibrosa chamada túnica albugínea. Por cima desta fica o folheto visceral da túnica vaginal (Evans, de Lahunta, 2013). A túnica albugínea é formada principalmente por tecido conjuntivo denso modelado e por vezes contém também fibras musculares lisas (Dyce, 2010).

O testículo é formado por lóbulos que contêm tubos seminíferos contorcidos. No interior destes tubos encontram-se as células de Sertoli e as células da linhagem germinal (Dyce, 2010). Aqui desenvolvem-se os espermatozóides. Os tubos seminíferos, a certa altura, tornam-se rectilíneos, denominando-se tubos rectos (Evans, de Lahunta, 2013).

O mediastinum testis é um cordão do tecido conjuntivo que passa longitudinalmente através do meio do testículo e contém uma rede de espaços e canais chamados rete testis. Estas conectam os tubos rectos com os canais eferentes (Evans, de Lahunta, 2013).

O ligamento próprio do testículo liga-se à cauda do epidídimo, continuando-se por um ligamento curto chamado ligamento da cauda do epidídimo, que vai da cauda do epidídimo e túnica vaginal até à fáscia espermática. Estes 2 ligamentos são restos das 2 divisões do gubernáculo testicular embrionário (Aspinall, O'Reilly, 2004).

A maioria dos vasos, a artéria e a veia testiculares encontram-se no interior da cápsula do epidídimo. A artéria testicular e a artéria do canal deferente irrigam o testículo e o epidídimo. As veias testiculares seguem o modelo da artéria mas formam um intrincado plexo pampiniforme no cordão espermático que envolve a artéria testicular, os vasos linfáticos e os nervos.

A inervação testicular deriva da parte simpática do componente eferente visceral do sistema nervoso vegetativo (Evans, de Lahunta, 2013).

### **Descida dos testículos**

Na maioria dos mamíferos, os testículos migram do local onde se desenvolveram no interior do abdômen, ao lado dos rins, para uma zona exterior ao abdômen, normalmente para o escroto. Nestes espécies, se os testículos não efetuam a descida, a espermatogênese não se consegue realizar, ficando assim o animal esteril (Aspinall, O'Reilly, 2004). A espermatogênese necessita de uma temperatura de 2° a 4°C abaixo da temperatura corporal (Sinowatz, 2010)

Enquanto que estes eventos se processam na maioria dos animais durante a vida fetal, nos cães processam-se no momento do parto. Baumans, Dijkstra e Wensing (1983) descobriram que os fatores principais deste processo são representados primeiro por um sobredesenvolvimento e depois por uma regressão do gubernaculum testis. O gubernáculo é uma massa mesenquimatosa coberta pelo peritoneu, que se estende desde o testículo ao longo dos mesónefros até à zona inguinal. Liga-se ao polo caudal do testículo e à parte epididimal do canal mesonéfrico (Evans, de Lahunta, 2013).

Existem duas fases na migração dos testículos pelo canal inguinal. Na primeira fase, a parte extra-abdominal do gubernáculo desenvolve-se tanto em comprimento como em volume, dilatando assim o canal inguinal (Aspinall, O'Reilly, 2004). Quando esta dilatação ultrapassa o tamanho dos testículos e a resistência passiva diminui, os testículos passam pelo canal adjacente ao processo vaginal. Um aspeto importante da migração dos testículos é o de trazerem com eles o peritoneu visceral que se formou à sua volta na parede abdominal dorsal. Na segunda fase da migração testicular, o gubernáculo é transformado por degenerescência tecidular numa pequena estrutura fibrosa no interior do saco escrotal, deixando espaço para os testículos. Assim, o gubernáculo transforma-se no ligamento próprio do testículo. A degenerescência do gubernáculo faz com que o testículo se encontre na zona distal da túnica vaginal. Segundo os estudos efetuados por Bauman (1982), existe uma relação entre a actividade testicular e o sobredesenvolvimento e a regressão do gubernáculo. Na primeira fase da migração testicular, um fator testicular indeterminado estimula o sobredesenvolvimento do gubernáculo. Existe a teoria de que as células do estroma são a fonte deste fator (Evans, de Lahunta, 2013). Na

segunda fase, a testosterona produzida pelos testículos provoca a regressão do gubernáculo (Pasquini, Spurgeon, 1992).

Segundo Sinowatz (2010), a descida dos testículos ocorre normalmente em três fases: a primeira fase está associada com o aumento dos testículos e a regressão simultânea dos mesonefros. Os androgénios são responsáveis pela regressão do ligamento suspensor cranial e o testículo é libertado. A segunda fase, designada frequentemente por descida transabdominal, move os testículos para o nível da abertura interna do canal inguinal. A terceira fase, denominada de trans-inguinal, move os testículos para o escroto. Esta fase depende de androgéneos e envolve a orientação do testículo para o escroto. Embora os mecanismos de migração testicular para o escroto não sejam claros, nos cães está estabelecido que é no dia 50 que os testículos estão localizados na abertura interna do canal inguinal.

### **3. O epidídimo**

No epidídimo são depositados os espermatozóides até à ejaculação. É formado por um canal contorcido (ducto epididimário) cujas espirais são mantidas juntas por uma matriz de tecido conjuntivo denso. O epidídimo encontra-se na margem dorsolateral do testículo, sendo formado por cabeça, corpo e cauda. A cauda continua-se cranio-dorsalmente pelo ducto deferente, contribuindo este, junto com os vasos e os nervos testiculares, para a formação do cordão espermático (Evans, de Lahunta, 2013). A cabeça do epidídimo está fortemente ligada à cápsula testicular (Dyce, 2010).

### **4. O ducto deferente**

O ducto deferente começa na cauda do epidídimo e passa cranialmente pela margem dorsolateral do testículo, para depois continuar em posição dorsal no cordão espermático, entrando na cavidade abdominal pelo canal inguinal (Evans, de Lahunta, 2013). O ducto deferente é ondulado na fase inicial, mas quando se orienta para o abdómen, torna-se retilíneo (Dyce, 2010).

Na cavidade abdominal, este passa por uma prega do peritoneu, desce ventralmente em direção ao ureter ao nível do ligamento lateral da bexiga e penetra na próstata, abrindo-se na uretra pélvica, lateralmente em relação ao colículo seminal.

Liga-se ao testículo junto com a artéria e a veia do canal deferente através de uma prega especial da túnica vaginal chamada mesoducto deferente (Evans, de Lahunta,



2013). O trecho subterminal do ducto deferente tem maior volume, é fusiforme e relaciona-se com a bexiga. Tem a designação de ampola do ducto deferente ou glândula ampular (Dyce, 2010).

## **5. O cordão espermático**

O cordão espermático é formado pelo canal deferente e os seus vasos, os vasos e os nervos testiculares juntamente com o mesoducto deferente e o mesórquio (Aspinall, O'Reilly, 2004). Estes são mantidos juntos por um tecido conjuntivo laxo e envolvidas pelo folheto visceral da túnica vaginal (Evans, de Lahunta, 2013). O comprimento e o formato do cordão espermático varia conforme a posição e a orientação do testículo. O volume é dado pela artéria e pelas veias testiculares. As veias testiculares formam uma rede densa chamada plexo pampiniforme. Os nervos testiculares têm origem simpática, e a drenagem linfática é feita para os linfonodos que se encontram perto da bifurcação da aorta (Dyce, 2010).

## **6. A próstata**

A próstata envolve completamente a parte proximal da uretra pélvica ao nível do colo da bexiga (Dyce, 2010). É a única glândula sexual acessória que se encontra no cão. Varia em tamanho e peso conforme a idade, a raça e o peso do animal. A próstata desenvolve-se a partir de uma série de evaginações simétricas do epitélio da uretra pélvica que aparecem na sexta semana de gestação (Aspinall, O'Reilly, 2004).

A próstata tem receptores de androgénios e a castração em qualquer idade reduz significativamente o seu tamanho (Dyce, 2010).

A próstata tem uma forma semi-oval em secção transversal com a parte dorsal lisa. Apresenta um fosso mediano dorsalmente, palpável por via retal. A parte prostática da uretra passa dorsalmente em relação ao centro da glândula. Um septo mediano divide a próstata em lobo direito e lobo esquerdo. Cada um destes lobos, por sua vez, é dividido em lóbulos por trabéculas emanandas da cápsula para a uretra. Cada lóbulo é uma glândula tubulo-alveolar comporta cujos canais entram na uretra atravessando a parede da mesma.

A cápsula prostática é relativamente grossa, constituída por tecido conjuntivo fibroso rico em fibras de músculo liso (Evans, de Lahunta, 2013).

Os 2 ductos deferentes entram na próstata na sua parte craniodorsal. Continuam caudoventralmente até chegarem à uretra. Uma das funções da próstata consiste em oferecer um ambiente ótimo para a sobrevivência e a motilidade dos espermatozóides (Evans, de Lahunta, 2013).

## **7. O pénis**

O pénis é o órgão masculino copulador e está localizado entre o arco isquiático cranial e as coxas (Pasquini, Spurgeon, 1992). O pénis permite por meio da uretra, a passagem da urina e do esperma para fora do organismo. O pénis tem 2 superfícies principais, uma dorsal (dorsum penis) e uma ventral ou face uretral (facies urethralis) (Dyce, 2010).

Topograficamente falando, o pénis é formado por 3 partes:

- Base
- Corpo
- Glande

A base é formada por 2 componentes: raízes (crura) e o bulbo do pénis (Evans, de Lahunta, 2013).

O corpo é formado principalmente por 2 corpos cavernosos. Entre os dois corpos cavernosos existe um septo que, nos carnívoros, é completo. O corpo cavernoso não se estende até ao ápice do pénis (Evans, de Lahunta, 2013).

O corpo do pénis começa onde os 2 crura se unem distalmente ao bulbo. Os 2 crura ficam separados no corpo do pénis, sendo envolvidos pela túnica albugínea e formando os corpos cavernosos (Pasquini, Spurgeon, 1992).

A glande, por sua vez, é formada por uma estrutura semelhante a um anel chamada bulbus glandis (bulbo da glande) e pela pars longa glandis (a parte comprida da glande) que forma o ápice do pénis. Em estado de repouso, a glande encontra-se completamente interiorizada no prepúcio (Pasquini, Spurgeon, 1992, Evans, de Lahunta, 2013)

O bulbo do pénis diminui gradualmente como uma bainha uniforme e corresponde a um saco esponjoso parcialmente bilobado, muito bem irrigado, que se encontra entre os crura, e na proximidade do arco isquiático. O bulbo é a continuação do corpo esponjoso que envolve a zona caudal da uretra pélvica, toda a uretra peniana

e o terço proximal do osso peniano. A superfície externa do bulbo é coberta pelo músculo bulboesponjoso mediano (Evans, de Lahunta, 2013).

A pars longa glandis e o bulbus glandis são separados por um septo formado por tecido conjuntivo (Evans, de Lahunta, 2013).

O osso peniano encontra-se em todos os cães machos. Forma-se por um centro de ossificação do corpo cavernoso no 35º dia de gestação. O osso forma um eixo rígido da glans penis (Evans, de Lahunta, 2013).

A base do osso, na parte caudal liga-se ao corpo cavernoso. A zona cranial, o ápice, fica cada vez mais estreito até acabar numa ponta cartilaginosa que se liga por uma banda fibrosa à superfície profunda da coroa da glande (Evans, de Lahunta, 2013).

## **8. O prepúcio**

O prepúcio, chamado também bainha, é uma prega cutânea tubular formada por uma camada externa e uma interna. A camada externa, também designada lâmina externa, é formada por tegumento. A camada interna ou lâmina interna é como uma cobertura para a parte livre do pénis. O prepúcio liga-se à parede abdominal ventral proximalmente, sendo livre só a parte distal (Dyce, 2010).

A inervação do pénis e do prepúcio acompanham os vasos vasculares. Os nervos pélvicos são fibras motoras parassimpáticas (Dyce, 2010).

## **9. A uretra**

A uretra estende-se desde o óstio interno no colo da bexiga até ao óstio externo da extremidade livre do pénis. A uretra transporta urina, esperma e as secreções seminais para a ponta distal do pénis. É dividida em zona pélvica e zona peniana. A zona pélvica é dividida em zona pré-prostática e zona prostática. Nos cães, a zona pré-prostática não existe (Evans, de Lahunta, 2013).

A primeira parte da uretra é rodeada pela próstata. O lúmen da uretra é recortado por uma crista uretral. A crista uretral é localmente elevada para formar um colículo seminal (Dyce, 2010). A parte remanescente da uretra pelvica é acompanhada por uma fina manga de tecido cavernoso, rodeada por sua vez pelo músculo estriado uretral (Evans, de Lahunta, 2013).

O lúmen uretral alarga-se caudalmente em relação à próstata. Estreita-se novamente ao sair da pelve, sobre o arco isquiático (Dyce, 2010).

## **II.GENÉTICA**

### **A. Os cromossomas**

Os cromossomas contêm a informação genética de um organismo. Eles encontram-se no núcleo de todas as células eucarióticas, exceptuando-se os eritrócitos maduros dos mamíferos, sendo visíveis microscopicamente depois de submetidos a coloração (Hartwell, Hood, Goldberg, Reynolds, Silver, 2011).

Os cromossomas são formados por dois braços. Os braços unem-se através de uma estrutura chamada centrómero (Griffiths, Miller, Wessler; Suzuki, Lewontin, Gelbart, 2004). Conforme a posição do centrómero, os cromossomas podem ser:

- telocêntricos – quando o centrómero se encontra exatamente na extremidade terminal dos braços
- acrocêntricos – quando o centrómero se encontra perto duma extremidade dos braços
- submetacêntricos – o centrómero é localizado entre o centro e a extremidade dos braços
- metacêntricos – o centrómero fica no meio do cromossoma (Hartwell, et al., 2011).

O cariótipo de uma célula processa-se pelo arranjo de todos os conjuntos de cromossomas, conforme o tamanho e outras características, como a posição do centrómero. Cada espécie tem um cariótipo característico, mas, ao mesmo tempo, cada sexo de uma espécie apresenta, também, um cariótipo específico (cromossomos sexuais XY no macho e XX na fêmea, nos mamíferos). Na diferença do cariótipo entre espécies estão factores como: a forma, tamanho e número de cromossomas (Hartwell, et al., 2011, Nicholas, 2010).

Cada indivíduo de uma espécie tem os cromossomas agrupados em pares, tendo estes o nome de cromossomas homólogos. Existe, como já mencionámos, uma diferença entre os dois sexos numa mesma espécie. Um sexo tem os dois cromossomas de um par da mesma forma e mesmo tamanho, em relação ao outro sexo, em que estes são diferentes nestas características. Por isso, a determinação sexual faz-se com base na diferença entre os dois cariótipos, recebendo os cromossomas o nome de cromossomas sexuais ou gonossomas. Os restantes cromossomas chamam-se autossomas, sendo idênticos no macho e na fêmea. A

totalidade dos cromossomas, constitui o genoma (Griffiths, et al., 2004, Hartwell, et al., 2011).

Nos mamíferos, as fêmeas têm como cromossomos sexuais 2 cromossomas X, enquanto que os machos apresentam um cromossoma X e um Y. As células que apresentam pares de cromossomas homólogos chamam-se diplóides, com o número diplóide identificado com  $2n$  (sendo  $n$  um conjunto haplóide de cromossomas). Os cães têm o número diplóide  $2n=78$  (Hartwell, et al., 2011).

## **B. ADN**

Do ponto de vista químico, os cromossomas são formados predominantemente por ácido desoxirribonucleico (ADN) associado a uma classe especial de proteínas. Estas proteínas são as histonas, que contêm uma percentagem grande de arginina e lisina, aminoácidos com uma carga global positiva. O ADN junto com as histonas formam a cromatina. Por sua vez, esta divide-se em duas categorias: (Hartwell, et al., 2011).

- eucromatina – é activa na transcrição.
- heterocromatina – fica condensada durante todo o ciclo de vida da célula

Os cromossomas são constituídos predominantemente por eucromatina. A heterocromatina encontra-se em grande percentagem no cromossoma Y masculino.

O ADN é formado por 3 componentes químicos: (Griffiths, et al., 2004).

- fosfato
- um açúcar chamado desoxirribose
- 4 tipos de bases azotadas: adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T)

A adenina e a guanina têm uma estrutura de base comum e pertencem à classe das purinas. A citosina e a timina também têm uma estrutura básica comum, pertencendo à classe das pirimidinas. O conjunto de um ião fosfato, desoxirribose e uma base forma um nucleótido (Nicholas, 2010, Griffiths, et al., 2004). Os nucleótidos são unidos entre eles através de uma ligação covalente entre o fosfato ligado ao carbono 5' de um nucleótido e OH ligado ao carbono 3' do outro nucleótido. O ADN é formado por 2 filas de nucleótidos ligadas entre elas através de uma ligação de hidrogénio específica entre purinas e pirimidinas. É assim que se cria uma regra, na qual A liga-se a T e G a C, sendo estes os pares fundamentais.

Daqui resulta o facto de que as 2 filas de nucleótidos são complementares. Uma consequência desta regra de ligação é o facto de que as 2 filas formam uma dupla hélice (Griffiths, et al., 2004, Hartwell, et al., 2011). A regra de ligação entre as pirimidinas e purinas é a base do sistema de replicação do ADN (Klug, Cummings, Spencer, Palladino, 2012, Pierce, 2012). No momento da divisão da dupla hélice, as 2 filas de nucleótidos separam-se, e com base na regra de ligação, sintetizam-se 2 novas filas complementares às originais. Assim, duas hélices duplas são produzidas a partir de uma, o ADN replica-se, resultando num novo cromatídio. Esta duplicação de cromatídios pertence a uma etapa do ciclo celular, a fase S da interfase. A etapa de multiplicação das células diplóides chama-se mitose. Na meiose, uma célula diploide dá origem a 4 células haplóides (Griffiths, et al., 2004, Hartwell, et al., 2011).

## **C. A mitose e a meiose**

### **1. A mitose**

O ciclo de vida das células é representado pelas etapas pelas quais estas passam de uma divisão para outra. Este modelo repetitivo é formado por duas etapas principais: interfase e mitose. Durante o ciclo celular, toda a informação genética é transmitida da célula-mãe às células-filhas e é por isso que este processo é essencial para a genética (Klug, et al., 2006).

A interfase representa o período entre duas divisões celulares sucessivas, em que a célula cresce, desenvolve-se e funciona. Nesta etapa, duplica-se o ADN, são produzidas as proteínas e o ARN e produzem-se um grande número de reações químicas necessárias para o funcionamento da célula (Klug, et al., 2012, McGeady, Quim, FitzPatrick, Ryan, 2006, Klug, et al., 2006).

A fase mitótica é a fase de divisão celular ativa na qual se realiza a divisão do material nuclear, que tem o nome de mitose, e a divisão do citoplasma, chamada citocinese. Nesta fase, os cromossomas copiados segundo o modelo original separam-se, sendo este processo crítico, por resultarem células com um conjunto completo da informação genética. A citologia considera várias fases de mitose: profase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (Klug, et al., 2012).

### **a) A profase**

É a fase mais comprida da mitose (Klug, et al., 2012).

Os cromossomas formados por cromátides-irmãs condensam-se. Fora do núcleo, em cada polo da célula aparecem os centrossomas, formados por pares de centríolos, multiplicados na interfase. Entre os dois centrossomas forma-se o fuso acromático de divisão, formado por microtúbulos. Com a ajuda dos microtúbulos, os cromossomas deslocam-se em direção aos centríolos, que se encontram nos polos opostos da célula. Os microtúbulos são muito importantes nesta etapa, porque pela diminuição e pelo aumento deles, deslocam-se os cromossomas (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

Nesta fase, o invólucro nuclear começa a desintegrar-se. É também agora que começa a formação dos cinetocoros, um complexo proteico que se liga, a nível do centrómero, a cada cromatídio (Klug, et al., 2012).

### **b) A prometafase e a metafase**

A prometafase começa no momento da destruição completa do invólucro nuclear (Klug, et al., 2012).

Para poder migrar, os cromossomas ligam-se aos microtúbulos com a ajuda dos cinetocoros. Nesse momento, aqueles começam a migração para a zona equatorial da célula (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

Na metafase, os cromossomas encontram-se na região equatorial, que agora se irá chamar placa metafásica ou placa equatorial (Klug, et al., 2012).

Portanto, a prometafase é o período em que os cromossomas migram, e a metafase só se refere ao seu posicionamento equatorial na placa metafásica (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

### **c) A anafase**

A anafase é a fase mais curta da mitose. Neste momento, as cromátides irmãs de cada cromossoma começam a separar-se na zona do centrómero, ficando cada uma ligada aos microtúbulos. Cada uma delas é atraída para cada um dos polos da célula. A migração delas realiza-se devido ao encurtamento dos microtúbulos (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

#### **d) A telofase**

A telofase é a etapa final da mitose. Nesta fase, em cada polo da célula encontra-se um conjunto completo de cromossomas. Estes começam a descondensar, e à volta deles começa a formar-se o invólucro nuclear. A formação deste representa o fim da mitose (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

Enquanto isso, realiza-se também a citocinese, a divisão do citoplasma. Em consequência deste processo final, resultam duas células filhas, com conjuntos completos de cromossomas ( $2n$ ) (Klug, et al., 2012).

## **2. A meiose**

A meiose é dividida em 2 etapas principais: primeira divisão meiótica e segunda divisão meiótica (Klug, et al., 2012). Este processo só se observa em gametogénese, na consequência do qual são produzidos gâmetas haplóides, tendo um único conjunto de cromossomas ( $n$ ). Esta redução cromática do material genético ocorre porque na eventualidade da fertilização, os dois gâmetas haplóides combinam-se para formar um zigoto diplóide. Durante a meiose produz-se também uma troca de material genético entre cada par homólogo de cromossomas (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

### **2.1. A primeira divisão meiótica**

A meiose é formada por: profase I, metafase I, anafase I e telofase I.

#### **a) A profase I**

No início desta fase, há  $2n$  cromossomas, cada um deles formado por dois cromatídios. Devido à complexidade dos processos que ocorrem nesta fase, esta foi dividida em 5 estádios: leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

- **Estadio Leptóteno**

Nesta sub-etapa a cromatina começa a condensar-se de maneira localizada, dando origem a cromómeros, tendo estes o aspeto de contas. O emparelhamento dos



homólogos é precedido por um processo chamado procura de homólogo, que começa nesta sub-etapa (Klug, et al., 2012).

- Estadio Zigóteno

O processo da procura de homólogo continua e produz-se um alinhamento dos cromossomas homólogos. Depois, começa o emparelhamento destes, por meio de um complexo sinaptonémico. Assim, no fim do estadio zigóteno, os homólogos emparelhados recebem o nome de bivalentes. Apesar de ambos os membros dos bivalentes terem dois cromatídios, cada membro ainda não é visível como sendo uma estrutura dupla (Klug, et al., 2012).

- Estadio Paquíteno

Os cromossomas continuam a enrolar-se e a encurtar. O complexo sinaptonémico continua a desenvolver-se, dando origem a sinapses. Agora, nota-se nitidamente que cada bivalente contém 4 cromatídios. Assim, os bivalentes recebem agora o nome de tétrada, sendo constituídos por 2 pares de cromátides irmãs (Klug, et al., 2012).

- Estadio Diplóteno

Os pares de cromátides irmãs começam a separar-se um do outro. Apesar de tudo, as cromátides ficam unidas em certas zonas que se chamam pontos de quiasma. O quiasma é a zona em que as cromátides que não são irmãs fazem troca de material genético. Este processo chama-se *crossing-over* (entrecruzamento) (Klug, et al., 2012).

- Estadio Diacinese

A diacinese representa a sub-etapa final da profase I. Os cromossomas afastam-se ainda mais, mas as cromátides não irmãs ficam ainda ligadas por quiasmas. É também agora que se produz a desagregação do invólucro nuclear. Da mesma maneira, as tétradas são ligadas pelos microtúbulos através dos 2 centrómeros, chegando à placa metafásica no final da profase I (Klug, et al., 2012).

### **b) A metafase I**

A metafase I é similar à metafase da mitose. Cada par de cromossomas homólogos é ligado com a ajuda do cinetocoro aos microtúbulos (Klug, et al., 2012). Tal como no caso da mitose, os pares de cromossomas homólogos encontram-se na placa equatorial (Hartwell, et al., 2011).

### **c) A anafase I**

Formam-se as díadas pela separação das tétradas. Este processo tem a denominação de disjunção. Depois desta separação, cada díada é atraída para cada um dos polos do fuso acromático (Klug, et al., 2012). Aqui às vezes surgem erros, nomeadamente, a separação e a migração não se realizam como seria normal, e este erro tem o nome de não disjunção. Cada díada contém um cinetocoro e é por isso que os centrómeros não se separam (McGeady, et al., 2006). Neste momento, os cromossomas que derivaram dos maternos e dos paternos são repartidos aleatoriamente pelos polos de fuso acromático (Hartwell, et al., 2011).

### **d) A telofase I**

Forma-se o invólucro nuclear à volta das díadas. Produz-se também a citocinese. A citocinese realiza-se de maneira diferente no caso da formação dos espermátócitos primários e dos oócitos de 1º ordem (McGeady, et al., 2006). No caso dos espermátócitos primários, o citoplasma divide-se de maneira igual entre as duas células filhas, mas no que diz respeito aos oócitos, uma célula recebe a maioria do citoplasma, e a outra recebe o resto (Klug, et al., 2012). A célula que recebe uma quantidade reduzida de citoplasma, chamar-se-á o primeiro glóbulo polar (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

Entre as divisões meióticas ocorre uma fase de repouso chamada intercinese (Klug, et al., 2012), sem síntese de ADN.

## **2.2. A segunda divisão meiótica**

### **a) A profase II**

Cada núcleo contém díadas formadas por um par de cromátides irmãs, unidas entre elas por um centrómero (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

### **b) A metafase II**

Os cromossomas estão localizados na placa metafásica. A metafase II é diferente da metafase I pelo facto de os cinetocoros se formarem em cada cromatídio em parte. Isto permite que os microtúbulos se liguem separadamente a cada cromatídio (McGeady, et al., 2006).

### **c) A anafase II**

O centrômero degrada-se, as cromátides irmãs separam-se e migram para os polos opostos do fuso acromático (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

### **d) A telofase II**

De modo similar à telofase I, o invólucro nuclear forma-se à volta de cada conjunto de cromatídios. Produz-se a citocinese, resultando quatro gâmetas haplóides. Como consequência do processo meiótico de uma célula diplóide resultam 4 células haplóides (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006). Além disto, devido ao mecanismo de entrecruzamento (crossing-over), cada cromatídio contém uma combinação de material genético paterno e materno (McGeady, et al., 2006). É assim que aumenta o nível de variabilidade genética de geração para geração (Klug, et al., 2012).

## **D. Erros durante a meiose**

Estes erros decorrem geralmente da incapacidade da separação e consequente migração para os polos de dois cromossomas homólogos durante a meiose I ou cromátidas irmãs na meiose II. O erro chama-se não disjunção e produz-se na maioria dos casos na meiose I (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006). A não disjunção provoca alterações numéricas ou estruturais dos cromossomas (Klug, et al., 2012). Pode ser afetado o número de autossomas ou cromossomas sexuais (McGeady, et al., 2006).

Os efeitos associados a estes erros das células gaméticas provocam morte embrionária ou distúrbios nos processos de desenvolvimento (Klug, et al., 2012, McGeady, et al., 2006).

## **III. Embriologia**

O intervalo necessário para o desenvolvimento completo de um ócito fertilizado, até ao final de gestação é de aproximadamente 61 dias e durante esse intervalo de tempo ocorrem processos variados de diferenciação, formação de padrões, migração celular e crescimento tecidual. Phemister (1974) dividiu o desenvolvimento pré-natal do cão em três períodos: o período do óvulo (dias 2-17), o período embrionário (dias

19-35) e o período fetal (35 dias até ao parto). O período do óvulo a seguir à fertilização é caracterizado pela formação dum blastocisto, que está livre no corno uterino. O período embrionário começa com a implantação do blastocisto e termina com a conclusão da organogénese. O período fetal é o tempo durante o qual as características físicas externas aparecem e ocorre um rápido crescimento, bem como a diferenciação histológica dos órgãos, nomeadamente as gónadas. (Pretzer, 2008).

O desenvolvimento do aparelho urogenital que inclui os rins, as gónadas e os tractos urinário e reprodutor, começa logo após a gastrulação, através da diferenciação da mesoderme intermediária. Este tecido embrionário prolifera e subsequentemente algumas células sofrem transição do mesenquima para o epitélio para gerar os túbulos que compõem o sistema reprodutor masculino e feminino, bem como os rins (Kobayashi e Behringer, 2003).

O conhecimento da determinação sexual em mamíferos é baseado em duas áreas de estudo: a primeira relaciona-se com a caracterização dos eventos biológicos que determinam o desenvolvimento sexual do indivíduo, incluindo os padrões de expressão dos genes, e a segunda com o estudo das mutações genéticas, que conduzem a fenótipos anormais (Wallen, 2006).

Nos mamíferos o sexo dos animais pode ser definido a nível dos cromossomas sexuais (XY ou XX), gónadas (testículos ou ovários) e fenótipo sexual (órgãos sexuais externos masculinos ou femininos). A regra geral do fenótipo sexual está relacionada com a presença (nos machos) e ausência (nas fêmeas) do cromossoma Y. Este está relacionado também com a presença (nos machos) e a ausência (nas fêmeas) dos testículos (Silversides et al., 2001).

No início da gestação (1ª e 2ª semana) os embriões de ambos os sexos apenas diferem no cariótipo (Lauber, 2010). A diferenciação sexual em mamíferos é um processo complexo que pode ser dividido em duas etapas: o desenvolvimento da gónada indiferenciada e a sua diferenciação em testículo ou ovário (Veitia et al., 2001).

O sexo cromossómico é normalmente determinado pela presença dos cromossomas XX ou XY e é estabelecido no momento da fertilização quando um espermatozóide que contém um cromossoma Y ou X se funde com o oócito, para determinar o sexo genético do zigoto. A presença do cromossoma Y ou do gene SRY ativa a cascata de eventos moleculares e celulares levando à diferenciação de vários tipos de células somáticas (Sertoli e Leydig) e à organização da estrutura do testículo. O

estabelecimento dessas células somáticas garante a produção da hormona anti-Mülleriana e de andrógenos (McGeady et al., 2006).

As células germinais primitivas (CGP) diferenciam-se no epiblasto dos embriões e, seguidamente, migram para a parede do saco vitelino, numa área perto da alantóide. Depois, migram para as gónadas indiferentes. Sugere-se que elas possam ser atraídas para a crista genital através de fatores quimiotáticos. Apenas as células que atingem as gónadas primitivas sobrevivem e vão continuar a diferenciar-se. Seguidamente são envolvidas em compartimento específicos, diferenciando-se em cordões testiculares no caso dos machos e cordões corticais no caso das fêmeas. Durante a fase indiferenciada os embriões de ambos os sexos possuem dois sistemas de ductos, os ductos mesonéfricos pares (ductos de Wolff) e os ductos paramesonéfricos (ductos de Müller), também pares (Sinowatz, 2010). O fator determinante testicular (*testis determining factor*) é aquele que determina a progressão para o desenvolvimento do macho ou da fêmea e é controlado apenas pelo cromossoma Y (Pretzer, 2008).

No embrião masculino, os ductos mesonéfricos transformam-se no sistema ductal do aparelho sexual masculino, enquanto que os ductos paramesonéfricos desaparecem. No embrião feminino sob a influência de estrogénios, os ductos paramesonéfricos desenvolvem-se e diferenciam-se em trompa uterina, útero e vagina (porção cranial), enquanto que os ductos mesonéfricos atrofiam. (McGeady et al., 2006).

Estima-se que entrem na crista genital entre 1000 a 2000 CGP e alguns dias após a colonização desta, a actividade mitótica é suspensa. Nos cães as CGP são detetadas na crista genital ao fim de 21 dias. (McGeady et al. 2006, Sinowatz, 2010). Enquanto que no primórdio do testículo, as CGP não realizam meiose até à puberdade, as CGP do primórdio do ovário começam a meiose durante o desenvolvimento fetal (Sinowatz, 2010).

As células dos cordões sexuais primitivos continuam a proliferar e penetrar a medula para formar cordões testiculares. Os cordões testiculares são constituídos por CGP e células Sertoli periféricas. Posteriormente estes cordões formarão a rete testis. À medida que os cordões testiculares se diferenciam, forma-se uma densa camada de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea, a qual no caso do cão, pode ser visualizada a partir do dia 29 (Sinowatz, 2010). No mesênquima, entre os cordões testiculares, surge a primeira geração de células de Leydig e nos dias que se seguem, estas células irão causar um aumento da produção de testosterona e

androstenediona. Esta atividade endócrina é importante para a diferenciação do sistema de ductos sexuais masculinos, para o desenvolvimento dos órgãos genitais externos e para a diferenciação dos centros sexuais a nível do cérebro, os quais são importantes para o desenvolvimento do comportamento masculino (Sinowatz, 2010). Em embriões masculinos só é possível detetar a transcrição do gene SRY na crista genital no início da diferenciação dos testículos (Sinowatz, 2010).

A primeira geração de células Leydig gradualmente involui e mais tarde é substituída pela segunda geração (Sinowatz, 2010).

Depois de várias semanas a meses, a segunda geração de células Leydig diferencia-se a partir de tecido conjuntivo e são elas as responsáveis pela iniciação e posterior estimulação da espermatogénese (Sinowatz, 2010).

Intimamente associada com o desenvolvimento dos sistemas de ductos genitais masculinos está a formação das glândulas sexuais acessórias (as vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbo-uretrais). A sua formação requer estimulação androgénica e interação epitélio – mesenquimatoso (Sinowatz, 2010).

O desenvolvimento da genitália externa do sexo masculino é controlado por androgénios a partir dos testículos fetais. Ocorre um alongamento rápido do tubérculo genital originando o pénis. Com o seu crescimento contínuo, a uretra peniana toma forma, por dobradura ventral e fusão da linha média das pregas urogenitais. A glândula do pénis origina-se a partir do ápice do tubérculo genital. As elevações genitais formam o escroto (Sinowatz, 2010).

Nos animais do sexo feminino, a expressão de Dax-1, na ausência do SRY, suprime a formação do testículo e permite que as gónadas indiferenciadas se desenvolvam em ovários. Tal como no desenvolvimento testicular, é necessária a presença de CGP viáveis para a diferenciação do ovário. Após as CGP terem atingido a crista genital, permanecem concentradas no exterior (córtex), região do futuro ovário (Sinowatz, 2010).

Têm sido propostos três locais de origem das células foliculares: (1) epitélio celómico; (2) células mesonéfricas; (3) a combinação de ambas (Sinowatz, 2010).

As CGP são rodeadas por células foliculares, e transformam-se em oogónias, as quais proliferam por mitose durante algum tempo e depois entram na profase I da meiose. Com o início da profase da primeira divisão meiótica, as células germinativas, chamadas de oócitos primários, em conjunto com as células foliculares, formam folículos primordiais. Os oócitos continuam a divisão meiótica até

atingirem o estadio diploteno, permanecendo nele. Os que foram selecionados para ovulação durante a foliculogênese pós-natal continuam a meiose (Sinowatz, 2010).

De acordo com as espécies, os ovários também sofrem um deslocamento, em sentido posterior e lateral. Nos cães a migração não é muito pronunciada e a posição final dos ovários é estabilizada por ligamentos, que são restos de estruturas associadas ao mesonefro (Sinowatz, 2010).

Como já foi referido, nas fêmeas os ductos mesonéfricos regredem devido à ausência de testosterona. As células dos ductos paramesonéfricos proliferam e diferenciam-se, formando o oviduto, o útero, o cérvix, e a parte cranial da vagina.

As porções anteriores dos dois ductos de Müller tornam-se ovidutos. A vagina tem uma origem dupla: a sua porção anterior deriva dos ductos paramesonéfricos (de Müller), enquanto que a porção posterior deriva do seio urogenital (Sinowatz, 2010).

O seio urogenital desenvolve-se na vagina e vestíbulo. O tubérculo genital diferencia-se o clitóris e as pregas urogenitais originam os lábios da vulva (Lyle, 2007).

**Tabela 1. As diferenças no desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino e masculino (McGeady et al., 2006).**

<b>Estrutura embrionária</b>	<b>Derivado no sistema reprodutor masculino</b>	<b>Derivado no sistema reprodutor feminino</b>
<b>Células germinativas primitivas</b>	Espermatozóides	Oócitos
<b>Gónada</b>	Testículos	Ovários
<b>Cordões sexuais</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos seminíferos</li> <li>• Células de Sertoli</li> </ul>	Células foliculares
<b>Tubos mesonéfricos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ductos eferentes</li> <li>• Paradídimo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epoophoron</li> <li>• Paroophoron</li> </ul>
<b>Ductos mesonéfricos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Epidídimo</li> <li>• Ductos deferentes</li> </ul>	O ducto de Gärtner
<b>Ductos paramesonéfricos</b>	Apêndice testicular	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubas uterinas</li> <li>• Útero</li> <li>• Parte cranial da vagina</li> </ul>
<b>Seio urogenital</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A uretra pélvica</li> <li>• Próstata</li> <li>• A uretra peniana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vestíbulo vaginal</li> <li>• Glândulas vestibulares</li> </ul>
<b>Tubérculo genital</b>	Glande do pénis	Clitóris
<b>Pregas urogenitais</b>	Copo de pénis e uretra cavernosa	Lábios da vulva
<b>As elevações genitais</b>	O escroto	-



## **A. Biologia Molecular**

Recentemente foram estabelecidos alguns dos mecanismos moleculares da diferenciação gonadal. Um dos primeiros genes necessários à formação da gónada primordial é o WT1, que é expresso na mesoderme intermédia e também desempenha um papel importante no desenvolvimento dos rins. O Lim1 é outro gene importante na fase inicial do desenvolvimento gonadal, pois na sua ausência, as gónadas não se formam (Sinowatz, 2010). Outro gene, fator de esteroidogenese 1 (SF 1), é expresso na gónada indiferenciada, bem como na medula supra-renal em desenvolvimento, que se forma a partir de células na parte cranial da mesoderme esteroidogénica (Sinowatz, 2010).

A descoberta do gene SRY na década de 90 foi o passo crucial para a compreensão geral da determinação sexual. Esta descoberta foi feita através da análise de possíveis casos de reversão sexual em seres humanos e agora, é evidente que existem grandes avanços (isto é, a identificação de novos genes da cascata de diferenciação sexual em particular da análise de indivíduos hermafroditas) (Vaiman, Pailhoux, 2000).

Na determinação sexual dos mamíferos os animais XY, na presença do gene SRY, desenvolvem testículos e os animais que não possuem o gene desenvolvem ovários (Wallen, 2006). Embora o mecanismo molecular, pelo qual o SRY provoca indução testicular, seja pouco claro, é ele que provavelmente regula a expressão de outros genes e confere o fenótipo celular (McGeady et al., 2006).

O SRY desencadeia a formação do testículo por inibição do gene WNT4, um membro da família de recetores nucleares, que também é expresso na gónada indiferenciada. A inibição do gene WNT4 é necessária para uma gónada geneticamente masculina expressar o seu fenótipo e tornar-se num testículo (Sinowatz, 2010).

Alguns genes envolvidos na determinação sexual de mamíferos (WT1, SRY, SOX9, WNT4, Dax-1) foram isolados através do estudo de indivíduos com reversão sexual (Sinowatz, 2010). Genes a jusante do SRY, como SOX9 e Sf1 estimulam a diferenciação das células de Sertoli e de Leydig. A expressão do SRY também é importante para a formação da túnica albugínea.

A função do gene Sf1 permanece obscura. As cristas genitais começam a formar-se e são colonizadas por células germinativas, que aguardam os sinais corretos para direccionar a sua migração. Deste modo o Sf1 não está envolvido na especificação

do desenvolvimento inicial das gónadas. Em vez disso, o gene Sf1 parece ser necessário para a diferenciação e/ou manutenção e crescimento de células somáticas já presentes na gónada indiferenciada (Swain and Badge, 1999).

A determinação sexual requer uma interação entre o SRY e o SOX9 (McGeady et al., 2006). Tal como o SRY, o gene SOX9 é membro do grupo de proteínas de alta mobilidade que se associam com o ADN (Kothapalli et al., 2005). A proteína do gene SRY atua como fator de transcrição do SOX9 (McGeady et al., 2006, Kothapalli et al., 2005).

Foi também demonstrado que os genes GATA4 e FOG2 são importantes no desenvolvimento normal dos testículos, bem como para a sua diferenciação (Manuylov et al., 2011). O gene GATA4 codifica um fator de transcrição que contém um domínio em “dedo de zinco” e o gene FOG2 é o seu co-fator. Ambos promovem a expressão do SRY.

Dados recentes mostram que, pelo menos em ratinhos, a segunda fase da descida testicular depende da expressão do gene *Insl-3* (Sinowatz, 2010).

O desenvolvimento do sistema de ductos genitais masculinos depende de hormonas. A substância inibidora Mülleriana (MIS) é o primeiro produto de secreção do testículo fetal marcando assim o início da função testicular. A MIS é produzida pelas células de Sertoli embrionárias, e suprime o desenvolvimento dos ductos Müllerianos (paramesonéfricos) deixando apenas os vestígios das suas extremidades anteriores e posteriores (Sinowatz, 2010).

A testosterona produzida a partir das células de Leydig embrionárias estimula o desenvolvimento do ducto mesonéfrico (de Wolff) que se torna o principal sistema de drenagem para o testículo. A testosterona e o seu principal metabolito, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, são mediadores da diferenciação do ducto mesonéfrico para formar o epidídimo, canal deferente. O desenvolvimento regional dos ductos genitais masculinos é também influenciado por genes Hox. Estes genes são expressos ao longo do ducto mesonéfrico, da cauda do epidídimo até ao ponto em que o ducto deferente se junta à uretra (Sinowatz, 2010).

O desenvolvimento da próstata deriva de ações moleculares dos genes Hoxa-13 e Hoxd-13, que determinam em que local do seio urogenital, a próstata se vai formar. A dihidrotestosterona, atuando através de recetores nas células mesenquimatosas, induz a secreção de fatores de crescimento (FGF10 e TGF $\beta$ -1) pelas células mesenquimatosas, que regulam a expressão do gene Sonic hedgehog (Shh) do epitélio do seio urogenital. Em resposta à sinalização do Shh, as células epiteliais

prostáticas evaginam do seio urogenital no mesênquima envolvente. O grau de formação das evaginações é controlado pela ação inibidora do BMP4. O desenvolvimento da próstata induz também algumas células do mesênquima para se diferenciarem em células musculares lisas (Sinowatz, 2010).

O gene mestre para o desenvolvimento do ovário é o WNT4, que causa a regulação positiva do Dax-1 que inibe a expressão do SOX9. O gene WNT4, em cooperação com vários outros genes localizados a jusante, é importante para a formação dos cordões corticais do ovário, para o desaparecimento dos cordões medulares e para a inibição do desenvolvimento de uma túnica albugínea na periferia do órgão (Sinowatz, 2010).

Foram recentemente identificados alguns genes que parecem ser essenciais para o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino: LIN1, PAX2, Emx2, e Wnt-7, e que se revelaram indispensáveis para o desenvolvimento do ducto paramesonéfrico (Sinowatz, 2010). Até à data, o gene Wnt4, que atua como um repressor da diferenciação do sexo masculino, é o único gene com uma função demonstrada na via da determinação do ovário (Vaiman, Pailhoux, 2000).

O gene Emx2 é expresso na mesoderme intermediária. A expressão deste gene só se evidencia durante os primeiros estágios de formação dos ductos paramesonéfricos e mesonéfricos. Isto sugere que este gene é necessário apenas numa janela de tempo específica, durante o desenvolvimento da mesoderme intermediária (Sinowatz, 2010).

Nos mamíferos os genes Wnt codificam glicoproteínas que influenciam múltiplos processos durante o desenvolvimento. O gene Wnt-4 tem um papel importante na determinação e diferenciação sexual das fêmeas. O Wnt-7 parece estar envolvido na manutenção da expressão de certos genes Hox (Hoxd 10 até Hoxd 13), bem como os Hoxa, que estão espalhados ao longo do aparelho reprodutor feminino (Sinowatz, 2010).

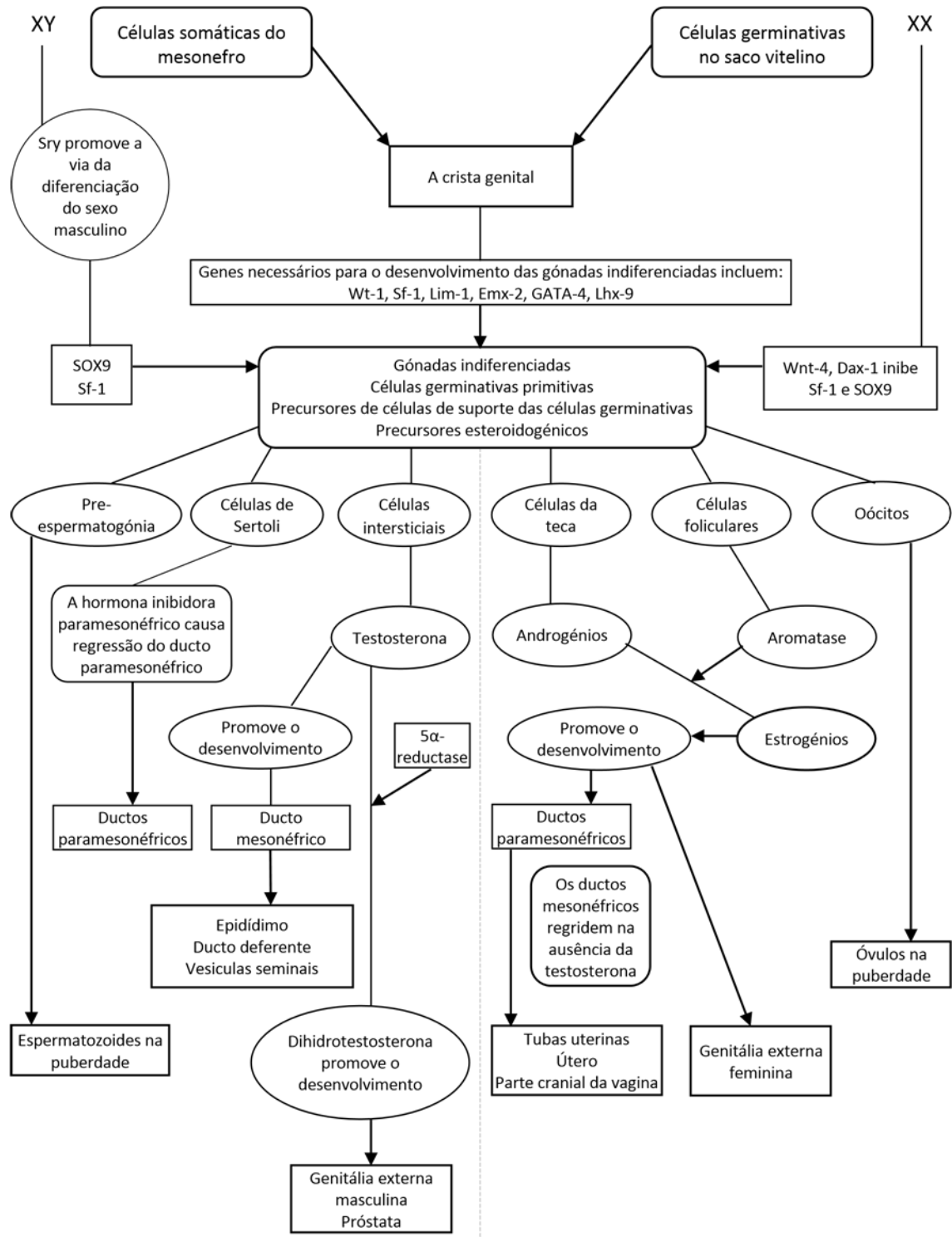
A ausência de MIS em fêmeas, permite que o ducto de Müller se transforme na maioria das estruturas tubulares do aparelho reprodutor feminino. Sob a influência de estrogénios, as células do ducto paramesonéfrico proliferam e diferenciam-se. O gene Wnt7a é expresso exclusivamente no epitélio luminal uterino, mas não no epitélio glandular. Em contraste, o gene Wnt5a é expresso principalmente no estroma do útero, durante o desenvolvimento pós-natal. A sinalização do gene Wnt é essencial para a formação das glândulas uterinas. O desenvolvimento das glândulas

uterinas envolvem também a remodelação das glândulas endométricas (Sinowatz, 2010).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) têm-se mostrado como sendo os reguladores-chave da ramificação glandular, incluindo a ramificação de glândulas uterinas (Sinowatz, 2010).

O estudo da intersexualidade em diferentes espécies de mamíferos parece uma estratégia promissora para identificar outros genes. Com efeito, a intersexualidade ocorre em muitas espécies de mamíferos (foram feitas numerosas observações em mamíferos domésticos), e também ocorre esporadicamente em mamíferos selvagens capturados. Na maioria dos casos a causa genética permanece desconhecida (Veitia et al., 2001).

**Tabela 2. As interações genéticas e celulares no desenvolvimento do aparelho reprodutor (McGeady et al., 2006).**



## **IV. Intersexualidade Canina**

Como já foi referido, a determinação sexual em mamíferos baseia-se numa determinante genética que controla a diferenciação das gónadas, as quais por sua vez, estabelecem o fenótipo sexual através da produção de hormonas. É previsível que ocorram diferentes tipos de inversão sexual se uma das três fases da diferenciação gonadal (formação das gónadas indiferentes, determinação sexual e desenvolvimento de testículos ou ovários) for interrompida ou alterada. Durante a complexa série de eventos que ocorrem no desenvolvimento do aparelho reprodutor, vão-se proporcionando várias oportunidades para que ocorram defeitos de desenvolvimento. Estas anomalias podem ocorrer ao nível dos cromossomas, durante a diferenciação das gónadas, ou na fase de diferenciação do sistema de ductos ou da genitália externa (McGeady et al., 2006).

O Consenso de Chicago recomendou o uso do termo “Disorder of Sex Development” (DSD) para estabelecer uma terminologia genérica que engloba qualquer problema observado ao nascimento, onde os órgãos genitais externos são atípicos em relação aos cromossomas ou às gónadas (Hughes, 2008).

Os DSD podem ser divididas em três categorias: distúrbios nos cromossomas sexuais, distúrbios no desenvolvimento das gónadas e distúrbios do desenvolvimento do fenótipo sexual. Estes distúrbios podem ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento sexual. Nos cães é muito importante fazer um diagnóstico apropriado, devido à variedade de distúrbios intersexuais (Poth et al., 2010).

A intersexualidade é vista como um distúrbio congénito raro em animais domésticos e caracteriza-se pelo facto dos indivíduos afetados possuírem todos ou partes dos órgãos genitais de ambos os sexos, resultando em diferentes fenótipos (Poth et al., 2010).

A intersexualidade é um termo que abrange diferentes estados biológicos de diferenciação sexual, em qualquer nível, desde os cromossomas até ao cérebro. Discrepâncias entre o sexo cromossómico e gonádico implicam a ocorrência de uma patologia específica envolvendo genes determinantes do sexo. Esta terminologia inclui doenças bem documentadas, como Freemartinismo em muitas espécies de ruminantes (que ocorre por causa de trocas hormonais e celulares entre fetos masculinos e femininos) ou a mutação dos genes que codificam o recetor de

androgénio, ou a enzima 5 $\alpha$ -redutase, que leva à insensibilidade androgénica (Vaiman, Pailhous, 2000).

O tubérculo genital é uma estrutura embriológica, a qual é comum a ambos os sexos, e que se diferencia em clitóris ou pénis. Na ausência de hormonas masculinas num feto genotipicamente masculino, o tubérculo genital permanece uma estrutura vestigial. A presença de material testicular num feto genotipicamente feminino, tem o efeito potencial de causar alongamento do tubérculo genital e o resultado pode ser o desenvolvimento inapropriado de um pénis (Harvey, 2004).

O termo hermafrodita deriva da mitologia grega de Hermafrodito, filho de Hermes e Afrodite, que era de natureza dupla, nem homem nem mulher, mas ao mesmo tempo ambos (Hare, 1976).

O hermafrodita verdadeiro define-se pela presença de estruturas ováricas e testiculares num mesmo indivíduo em qualquer combinação possível: (1) bilateral (ovotestis bilateral), unilateral (ovotestis unilateral) e alternante (ovário de um lado e testículo contra-lateral) (Poth et al., 2010).

A intersexualidade ocorre quando há alterações morfológicas e/ou funcionais da gónada fetal resultando numa deficiência ou ausência da MIS e/ou da hormona testicular androgénica, ou numa função ovárica alterada em determinadas formas de pseudo-hermafroditismo feminino. Também pode ocorrer se: a) houver perda ou redução da sensibilidade a uma hormona, por parte de um recetor de um órgão (por exemplo, na feminização testicular os ductos de Wolff, o seio urogenital e primórdios dos órgãos genitais externos são mais ou menos insensíveis à hormona testicular andrógena secretada pelos testículos) e b) se houver uma excessiva produção endógena (por exemplo, síndrome adrenogenital congénita) ou uma influência de androgénios exógenos (Hare, 1976).

O pseudo-hermafrodita feminino tem cromossomas XX (sem sinal da presença do gene SRY) e ovários, mas a genitália externa é masculina. No caso da cadela, esta apresenta um clitóris aumentado podendo mesmo apresentar próstata. A causa é o excesso de testosterona durante a gravidez. A razão desta concentração anormal de testosterona é muitas vezes desconhecida. Normalmente estes indivíduos são estéreis e é recomendada uma ovariectomia. No pseudo-hermafrodita masculino o género cromossómico é XY com o gene SRY intacto e funcional. Os testículos estão presentes, mas os órgãos genitais externos são femininos. Em vários casos o cão tem ovidutos vestigiais e útero. Os testículos podem estar localizados dentro do abdómen, escroto ou lateralmente à vulva. Pode haver

presença de pénis ou, mais frequentemente, um clitóris aumentado. Na presença de pénis e testículos, o diagnóstico é mais difícil e é necessária uma cirurgia abdominal para encontrar órgãos femininos vestigiais. Para atribuição do sexo exato em indivíduos não classificados, que não se encaixam nas categorias principais, é necessário efectuar-se o cariótipo e verificar a presença do gene SRY (Bigliardi et al., 2001).

Apenas alguns casos de hermafroditismo foram associados a raças de cães como Basset hound, Cocker Spaniel e Pug (Kim, 2006, Hare, 1976). A maioria dos casos de intersexualidade parecem ser casos isolados sem predisposição óbvia. No entanto foi descrita como sendo hereditária em algumas raças, como é o caso do Cocker Spaniel (Harvey, 2004). Um terço dos casos de hermafroditismo canino tem sido relatado na raça Cocker Spaniel, três vezes mais do que os casos encontrados em Beagles, a segunda raça mais comumente afetada (Hare, 1976).

São necessários estudos adicionais em pedigrees da raça como o Pinscher Alemão e o Berger Picard para comprovar um defeito genético hereditário e para se obter uma melhor compreensão das condições intersexuais no cão (Poth et al., 2010).

Em ocasiões raras os XX hermafroditas verdadeiros conseguiram reproduzir-se. Como pode ser hereditário, pelo menos metade dos irmãos de indivíduos afetados poderão ser portadores enquanto que um quarto podem não ser portadores. Como este processo patológico não existe nenhum teste laboratorial que permita identificar os portadores, não é recomendado manter estes indivíduos num programa de reprodução (Lyle, 2007).

As causas da intersexualidade são discutidas à luz dos conhecimentos atuais e da realização de estudos morfológicos, hormonais e citogenéticos detalhados, muito importantes para a plena compreensão desta realidade (Hare, 1976).

### **A. Alterações cromossómicas**

Os distúrbios cromossómicos resultam de alterações no número ou na estrutura dos cromossomas sexuais. Estes distúrbios resultam de eventos aleatórios durante a formação dos gâmetas ou no início do desenvolvimento embrionário, e podem ser observados em cães e em gatos de qualquer raça, não apresentando geralmente um padrão familiar. Os distúrbios cromossómicos incluem a síndrome XXY, XO, XXX, quimeras hermafroditas verdadeiros, quimeras XX/XY com testículos e quimeras XY/XY com testículos (Lyle, 2007).



A maioria dos animais com alterações cromossômicas tem alguns sinais clínicos. O historial mais comum é o anestro primário nas fêmeas fenotípicas e a incapacidade de procriação nos machos fenotípicos (Lyle, 2007).

As anomalias descritas nos cães incluem alterações congênitas no número de cromossomas sexuais e quimera/mosaicismo XX/XY.

Nos cães, o Síndrome de Klinefelter (XXY) resulta em hipoplasia dos testículos e malformações no trato genital masculino (Poth et al., 2010). Os cães afetados têm o cariótipo 79, XXY e, embora em cães e em gatos se desconheça a verdadeira incidência desta doença, é a alteração cromossômica sexual mais relatada (Lyle, 2007). Esta alteração pode ocorrer durante a meiose. Entre as alterações observadas no desenvolvimento de óvulos ou espermatozóides encontra-se uma condição chamada de não-disjunção. Se a não-disjunção ocorre no desenvolvimento de um óvulo, esse óvulo pode conter dois cromossomas X e a outra célula não ter cromossomas sexuais. O óvulo com dois cromossomas X, fertilizado por um espermatozóide de cromossoma Y, desenvolve-se num indivíduo XXY. O cromossoma Y permite o desenvolvimento testicular, que por sua vez resulta na produção de testosterona, e no aparecimento do fenótipo masculino (um indivíduo com órgãos genitais externos do sexo masculino). No entanto, a condição XX inibe a espermatogénese normal, e o resultado será um indivíduo com hipoplasia testicular (Feldman and Nelson, 2007).

Como referido anteriormente, um óvulo ou também um espermatozóide pode não conter nenhum cromossoma sexual. Se ocorre fertilização por um gameta contendo um cromossoma X (espermatozóide ou óvulo respectivamente), o resultado é um zigoto XO. Nos cães, pode ocorrer proestro prolongado e presença de ovários normais. Esta condição deverá ser tida em conta no diagnóstico diferencial nas fêmeas que não têm cio nos primeiros 2 até aos 4 anos e naquelas com pró-estro persistente (Feldman and Nelson, 2007).

A síndrome XXX é rara e a causa é a não-disjunção dos cromossómica sexuais, semelhante síndrome XXY (Feldman and Nelson, 2007). Neste caso, um oócito XX é fertilizado por um espermatozóide X. Esta determina fêmeas inférteis com órgãos externos mal desenvolvidos ou com um útero hipoplásico (Poth et al., 2010).

Na quimera ou mosaicismo XX/XY, existe mais do que uma linha celular. A quimera é causada pela fusão de diferentes zigotos ou células provenientes de diferentes zigotos, enquanto que o mosaicismo resulta da não-disjunção num único zigoto ou células derivadas de um único zigoto. Geralmente, o fenótipo d a quimera e mosaico

depende da proporção de tecido testicular nas gónadas e a sua atividade hormonal. Cadelas com um cariótipo XX/XO são inférteis e têm a genitália externa feminina. No caso do cão quimera ou mosaico, com cariótipo XX/XY, está associado o desenvolvimento de genitália ambígua e de ambos os testículos (Poth et al., 2010).

## **B. Distúrbios do desenvolvimento gonádico**

Os cães afetados com distúrbio gonádico têm uma guarnição cromossoma XY ou XX. Esta anomalia resulta em dois tipos de reversão sexual: reversão sexual XX ou reversão sexual XY. Ambas as condições causam desenvolvimento externo ambíguo, ou seja genitália em diferentes graus de desenvolvimento que se correlaciona positivamente com a quantidade de tecido testicular nas gónadas (Lyle, 2007).

A reversão sexual XX é subdividida em duas categorias atualmente denominadas de hermafroditismo verdadeiro XX (ovotesticular) e síndrome de XX masculino (testículos bilaterais). Os hermafroditas verdadeiros são caracterizados por terem simultaneamente tecido ovárico e testicular, e ocorre uma de três variações possíveis: bilateral, unilateral, e alternante. As variações do hermafrodita verdadeiro são: ovotestis bilateral (que é a combinação de gónadas mais comum), um ovotestis e um ovário, e finalmente um ovotestis e um testículo. Pode observar-se também um ovário e um testículo contralateral. A quantidade de tecido testicular está correlacionada com o grau de masculinização (Lyle, 2007).

A formação testicular em fêmeas com constituição cromossômica normal, parece ser contraditória. A etiologia e a patogénese desse fenómeno é apenas parcialmente entendida; são apresentadas algumas hipóteses na literatura. Os cães que foram testados nestas hipóteses eram SRY negativos significando que existe um mecanismo no desenvolvimento do tecido testicular nos cães que têm um cariotipo XX que não depende de SRY (Melniczek et al., 1995, 1999; Meyers-Wallen et al., 1999; Kuiper and Distl, 2004; Switonski et al., 2004; Nowacka et al., 2005; De Lorenzi et al., 2008; Buijtelts et al., 2009). Nos seres humanos, em 80% dos casos de síndrome de XX masculino e em 10% dos hermafroditas verdadeiros, existe uma translocação do gene SRY. No que diz respeito aos casos de cães estudados com reversão sexual XX, todos se mostram SRY negativos (Poth et al., 2012, Lyle 2007). Nestes estudos, os cães afetados têm o cariotipo 78, XX com graus variáveis de diferenciação testicular na gónada. Desconhecem-se os genes responsáveis pela

indução testicular na ausência do SRY, em cães, seres humanos, porcos e cavalos (Lyle, 2007).

Um estudo feito por Pujar et al. (2007) indica que pode existir outro locus de um gene, provavelmente localizado numa região de CFA29, que pode ser causador de reversão sexual em cães.

Num estudo feito no American Cocker Spaniel foi comprovado que a característica autossómica recessiva se encontra tanto nos hermafroditas verdadeiros XX, como nos machos XX. Presume-se que é provável acontecer noutras raças de cães, como German Shorthaired Pointer, Beagle, English Cocker Spaniel, Kerry Blue Terrier, Norwegian Elkhound, Pug, Weimaraner, e Cão de Pastor Alemão (Stewart et al., 1972; Williamson, 1979; Randolph et al., 1987; Meyers-Wallen and Patterson, 1989; Meyers-Wallen et al., 1995, 1999; Melniczek et al., 1999; Switonski et al., 2004).

### **C. Distúrbios no desenvolvimento fenotípico**

Nos cães afetados, o sexo cromossómico e gonádico coincidem, mas a genitália externa tem características do sexo oposto e estes animais são classificados como pseudo-hermafroditas femininos ou masculinos, consoante o sexo gonádico. Os casos de pseudo-hermafroditismo ocorrem mais frequentemente nos machos do que nas fêmeas (Poth et al., 2010).

As síndromes que foram descritas em cães e em gatos são: pseudo-hermafroditismo feminino, pseudo-hermafroditismo masculino, síndrome do ducto Mülleriano persistente e defeitos de masculinização andrógeno – dependentes. A descida dos testículos para o escroto completa o desenvolvimento do sexo fenotípico. O controlo genético e hormonal da descida testicular não é completamente compreendido, e a classificação de criptorquidia como um distúrbio do sexo fenotípico é considerada discutível por alguns autores (Lyle, 2007)

#### **1. Pseudo-hermafroditismo feminino**

O pseudo-hermafrodita feminino tem um cariotipo XX, ovários e masculinização dos órgãos genitais externos ou internos. Esta síndrome é raramente encontrado nos cães. É possível que a administração iatrogénica de androgénios ou progestagénios durante a gestação possam ser responsáveis por esta síndrome (Lyle, 2007).

## **2. Pseudo-hermafroditismo masculino**

O pseudo-hermafrodita masculino tem um cariótipo XY, testículos e um grau variável de feminização dos órgãos genitais externos ou internos. Neste tipo de pseudo-hermafroditismo podemos incluir os machos com síndrome do ducto Mülleriano persistente e defeitos de masculinização androgénio – dependentes (Lyle, 2007).

### **a) A síndrome do ducto Mülleriano persistente**

A síndrome do ducto Mülleriano persistente é mais frequentemente descrito na raça Schnauzer miniatura (Marshall, Oehlert, Haskins, Selden e Patterson, 1982), com a presença de cariótipo XY, testículos bilaterais e órgãos genitais externos masculinos. Os ductos Müllerianos e os ductos de Wolff estão igualmente presentes. Nesta raça a síndrome é hereditário, tendo um padrão autossómico recessivo. Esta síndrome é devido a um defeito dos receptores para a MIS que estão presentes nos ductos Müllerianos (Lyle, 2007).

Os animais com síndrome do ducto Mülleriano persistente podem ter infecções do trato urinário, prostatite, hiperplasia quística do endométrio, piómetra e tumores testiculares (Hare, 1976; Kelly et al., 1976; Chaffaux et al., 1980; Marshall et al., 1982; Svendsen et al., 1985; Meyers-Wallen and Patterson, 1986, 1989; Nickel et al., 1992; Simpson et al., 1998; Volpe et al., 2000).

### **b) Os defeitos de masculinização androgénio – dependentes**

Os animais com estes defeitos tem o cariótipo XY, testículos bilaterais e nenhum derivado dos ductos Müllerianos e de Wolff.

Devido à masculinização incompleta do seio urogenital, a localização do orifício urinário é anormal. Este defeito chama-se hipospadia. Os animais que apresentam hipospadia podem apresentar também criptorquidia, hipoplasia peniana, desvio ventral do pênis, ou anomalias do prepúcio ventral.

Devido ao defeito do recetor de androgénio, a masculinização é incompleta ou ausente, apesar da produção normal de testosterona e dihidrotestosterona (Lyle, 2007).

Estes animais têm testículos, que segregam testosterona e MIS. Como há uma mutação dos receptores para a testosterona e dihidrotestosterona, não se observam

derivados dos ductos mesonéfricos. A MIS provoca a regressão dos ductos paramesonéfricos.

### **D. Diagnóstico e tratamento**

O mapa do genoma canino é abrangente, contendo 3.270 marcadores e as sequências de 900 genes mapeados para cromossomas específicos (Wallen, 2006). A informação sobre o genoma canino tem facilitado o estudo de doenças hereditárias. Uma vez que estes genes são identificados, os testes de ADN tornam-se parte da prática de veterinária geral. Os testes baseados no genótipo não só ajudam no diagnóstico de animais que estão doentes, mas permitem que os clínicos determinem se os animais saudáveis são geneticamente predispostos a desenvolver a doença ou se são portadores de doença hereditária. A prevenção de doença hereditária deverá representar uma melhoria de qualidade de vida de animais de companhia e respectivos proprietários (Wallen, 2006).

A categorização correta de um paciente com suspeita de um distúrbio do desenvolvimento sexual requer uma avaliação citogenética e descrição macroscópica e histopatológica das gónadas, dos órgãos genitais internos e da genitália externa (Lyle, 2007).

Cães com anomalias óbvias na genitália externa podem ser rapidamente reconhecidos, mas como já foi referido, as anomalias podem ocorrer em qualquer etapa de desenvolvimento. Muitas anomalias do desenvolvimento sexual são subtis ou estão ocultas no que diz respeito ao que pode ser observado durante o exame físico.

O diagnóstico definitivo de uma anomalia cromossómica só se pode estabelecer a partir da realização de cariótipo. O diagnóstico inclui um exame físico, análise das hormonas sexuais. São úteis os métodos imagiológicos como a ecografia. (Bigliardi et al.2001). Se a genitália externa parecer normal ou apenas mostrar ligeiras alterações, o diagnóstico pode ser problemático. É necessário fazer uma análise morfológica extensa para determinar o sexo fenotípico a constituição gonadal e uma análise citogenética. Adicionalmente, deve ser realizada uma análise do pedigree para pesquisar se há distúrbios hereditários e para excluir a reprodução entre pais e irmãos afectados (Poth et al., 2010).

O exame histológico das gónadas é a melhor forma de determinar o sexo gonádico, podendo ser realizado através de amostras obtidas por biópsia. O sexo fenotípico

pode ser estabelecido através da análise de uma descrição detalhada dos órgãos genitais internos e externos. É necessário determinar: (1) se a vulva ou prepúcio são adequados na sua forma e posição, (2) se um clitóris ou pénis está presente, (3) avaliar a localização da abertura da uretra, e (4) se o cão tem próstata ou vagina caudal (Feldman and Nelson, 2007).

Se o estudo dos cães intersexuados contribuir para a elucidação da determinação e da diferenciação sexual, nesta ou em qualquer outra espécie, é essencial um exame detalhado do sistema reprodutor e das glândulas supra-renais e hipófise, juntamente com estudos citogenéticos (Hare, 1976).

Quando há suspeitas de problemas congénitos, antes de qualquer outro teste, deverá ser realizada uma cariotipagem, e se o estado intersexuado for confirmado, a ressecção cirúrgica do trato genital é o tratamento de escolha, para evitar problemas clínicos e o possível desenvolvimento de doenças neoplásicas (Bigliardi et al., 2011). O diagnóstico de hermafroditismo verdadeiro XX depende das suspeitas adquiridas num exame físico cuidadoso. A confirmação é baseada na avaliação histológica da gónada. Podem surgir concentrações de testosterona e presença de tecido testicular num cão que é fenotipicamente do sexo feminino. É necessário proceder a uma cariotipagem para provar que o indivíduo é hermafrodita XX, ou é um macho XX (Feldman and Nelson, 2007).

Foi referido que suplementar cadelas grávidas com progesterona sintética pode dar origem a anomalias nos fetos, tais como a intersexualidade. No entanto são necessários mais estudos para comprovar esta teoria (Harvey, 2004).

Em suma, para todos os pacientes com suspeita de um DSD, são necessárias descrições cuidadosas dos órgãos sexuais externos e internos, bem como a histopatologia das gónadas e do trato tubular, para clarificar o distúrbio com precisão. Recomenda-se uma gonadectomia e uma histerectomia (Lyle, 2007). É preciso também um cariótipo.

No caso dos machos, o animal pode apresentar um prepúcio e um pénis subdesenvolvido. Ocasionalmente pode haver hematúria e a urina ser atrativa para outros machos, o sangramento pró-estral é o resultado de tecido ovárico e uterino (Harvey, 2004).

A gonadectomia é o tratamento de escolha também nos casos em que o tubérculo genital se desenvolveu demasiado e a uretra atravessa o pénis subdesenvolvido, podendo surgir inflamações causadas pela urina se o prepúcio não cobrir o pénis. Os donos do animal devem garantir que a pele desta zona se encontra limpa e seca,

para evitar problemas de pele. Para prevenir a irritação podem ser usados vaselina ou cremes emolientes. Se as inflamações forem um problema intransponível, considera-se a medida extrema de amputação peniana (Harvey, 2004).

### **Piômetra**

A piômetra é uma doença frequente do útero, mas raramente associada a DSD. É caracterizada pela acumulação de material purulento no lúmen uterino nas fêmeas inteiras (Smith, 2006; Pretzer, 2008). A piômetra é mais frequentemente diagnosticada entre as quatro semanas e os quatro meses após o estro (Smith, 2006). Existem também casos de cadelas que foram diagnosticadas com piômetra na fase de anestro (Mateus e Eilts, 2010).

A piômetra pode ser fechada ou aberta e é uma emergência médica (Pretzer, 2008). Ocorre devido a exposição prolongada de endométrio a progesterona após um período de estimulação estrogénica (Egenvall, Hagman, Bonnett, Hedhammar, Olson, & Lagerstedt, 2001; Smith, 2006). Esta surge mais frequentemente nos animais nulíparos (Fukuda, 2001; Smith, 2006), com mais de 4 anos de idade (Smith, 2006). Nas cadelas é mais frequente entre os 8 e 11 anos de idade (Fukuda, 2001).

Algumas raças são mais predispostas como os Collie, Rottweiler, Cavalier King Charles Spaniel, Golden Retriever (Egenvall, Hagman, Bonnett, Hedhammar, Olson, & Lagerstedt, 2001), Bernese Mountain Dog (Mateus e Eilts, 2010) e Irish Terrier (Pretzer, 2008).

Num estudo feito por Kim e Kim (2006), foi observado um pseudo-hermafrodita de raça American Cocker Spaniel de 3 anos de idade que apresentava piômetra.

A piômetra resulta da interação de diferentes factores etiológicos, como as alterações do endométrio, a influência das hormonas no ambiente uterino, a virulência das bactérias e a sua espécie, e os mecanismos de defesa (Mateus e Eilts, 2010). No presente não existe nenhuma correlação entre distúrbios na produção de hormonas ou na resposta do endométrio à progesterona ou ao estrogénio (Mateus e Eilts, 2010). A bactéria mais frequente encontrada nas cadelas na piômetra é a *Escherichia coli* (Mateus e Eilts, 2010; Smith, 2006). Outras bactérias que foram isoladas na piômetra são: *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pasteurella spp.* e *Proteus spp* (Mateus e Eilts, 2010).

## **1. Técnica cirúrgica**

As orientações da Association of Shelter Veterinarians reconhecem a aceitabilidade de muitas variações de procedimentos relacionados com castração, com a exigência de que ambos os ovários sejam completamente retirados (Frasson, 2012). Pode ocorrer piómetra de coto uterino quando uma porção do corpo ou do corno uterino não é removida e o animal apresenta uma elevada concentração sérica de progesterona. A causa deste aumento pode ser endógena, a partir de tecido ovárico remanescente, ou exógena, em virtude da administração de compostos à base de progesterona para o tratamento de dermatite (Fingland e Sicard, 2008).

Com uma técnica cirúrgica apropriada e com um anestésico com duração razoável, a ováriohisterectomia pré-púbere não acarreta o risco de morbidade ou mortalidade. De facto, em cães com mais de dois anos, o aumento do risco das complicações após ovário-histectomia foi associado ao aumento do tempo cirúrgico e ao peso corporal (Frasson, 2012).

## **2. Ovário - Histerectomia**

Após o animal ser anestesiado, deve-se esvaziar a bexiga manualmente e posicioná-lo em decúbito dorsal. Em seguida, prepara-se assepticamente toda a região abdominal ventral para a cirurgia. Na cadela, faz-se uma incisão na linha média ventral, desde o umbigo até ao ponto médio entre o umbigo e a margem do púbis (Fingland e Sicard, 2008). Incisões menos craneais tornam mais difícil a exteriorização dos ovários caninos. Em cadelas com peito profundo ou naquelas com o útero aumentado, pode estender-se a útero cranial ou caudalmente para permitir a exteriorização do trato sem que haja tração excessiva. Em cadelas pré-púberes, a realização da incisão no terço médio do abdómen caudal facilita a ligadura do corpo uterino (Hedlund, 2008). Em fêmeas caninas lactantes a incisão deve ser feita exatamente na linha média, a fim de evitar traumatismo nas glândulas mamárias (Fingland e Sicard, 2008). Faz-se uma incisão de 4 a 8 cm na pele e no tecido subcutâneo para expor a linha alba (Hedlund, 2008). Segura-se firmemente a linha alba ou a bainha do reto ventral, tracionando para fora e faz-se uma incisão para abrir a cavidade abdominal (Hedlund, 2008). Estende-se a linha de incisão cranial e caudalmente com uma tesoura de Mayo. Eleva-se a parede abdominal esquerda segurando a linha alba ou bainha do reto abdominal externo com uma



pinça (Hedlund, 2008). Pode-se localizar o corno uterino esquerdo, utilizando um gancho de ovário-histerectomia ou o dedo indicador (Fingland e Sicard, 2008). Se o corno uterino não puder ser localizado com o gancho, dobra-se a bexiga caudalmente e posiciona-se o corpo e os cornos uterinos entre o cólon e a bexiga (Hedlund, 2008). Se necessário desloca-se o omento e o intestino no sentido cranial, para visualizar o útero. De seguida, aplica-se uma pequena pinça hemostática através do ligamento próprio, de modo a auxiliar na retração caudal do ovário. Aumenta-se gradulamente a pressão no ligamento suspensor até que este se estire ou rompa. Identifica-se o Complexo Arteriovenoso Ovário (CAVO). Com uma pinça hemostática Rochester Carmalt, faz-se uma abertura no mesovário imediatamente caudal ao CAVO, numa área livre de vasos e gordura. Aplicam-se três pinças hemostáticas Rochester Carmalt e faz-se a transecção do CAVO (Fingland e Sicard, 2008). Aplica-se uma ligadura em circunferência em redor da pinça proximal e aperta-se a ligadura enquanto a pinça é removida. Deste modo a ligadura em circunferência é apertada no sulco de tecido feito pela pinça. Aplica-se uma ligadura por transfixão entre a ligadura em circunferência e a extremidade seccionada do CAVO. Em fêmeas caninas jovens, pode ser feita uma ligadura completa (em circunferência), em vez da ligadura por transfixão (Fingland e Sicard, 2008).

Verifica-se se há hemorragia no complexo após retirar a última pinça e caso haja, aplica-se uma segunda ligadura em circunferência no CAVO, proximal à primeira (Fingland e Sicard, 2008).

Segue-se o corno uterino esquerdo distalmente até a bifurcação e localiza-se o corno do CAVO direito. Os CAVO esquerdo e direito situam-se de forma imediatamente caudal aos pólos caudais dos rins ipsilaterais (Fingland e Sicard, 2008). De seguida faz-se a laqueação e transecção do CAVO direito, como foi descrito anteriormente. Secciona-se o ligamento largo (Fingland e Sicard, 2008).

Na maioria das fêmeas em estadio pré-parto, o ligamento largo pode ser rompido manualmente. Faz-se uma abertura no ligamento largo adjacente à veia e artéria uterinas, próximo ao cérvix. Traciona-se o ligamento largo cranialmente (e não ventralmente), até à libertação de ambos os ligamentos. Se o ligamento largo for muito vascularizado, pode-se fazer a ligadura dos grandes vasos individualmente ou a ligadura em massa do ligamento largo ou de porções do ligamento (Fingland e Sicard, 2008).

O corpo uterino situa-se ventralmente ao cólon descendente e dorsalmente à bexiga. Secciona-se o corpo uterino após aplicação de duas ligaduras e de seguida remove-se todo o útero proximal ao cérvix.

Deve-se verificar se há hemorragia nos pedículos do CAVO e no corpo uterino, antes da sutura abdominal. Localiza-se o pedículo do CAVO esquerdo mediante retração do cólon descendente em sentido medial, expondo a goteira paralombar esquerda. Localiza-se o pedículo do CAVO direito mediante a retração do duodeno em sentido medial, expondo a goteira paralombar direita (Fingland e Sicard, 2008).

#### **a) Complicações cirúrgicas**

A hemorragia é a complicação mais comum da ovário-histerectomia de fêmeas caninas que pesam mais de 25kg. As causas mais comuns incluem o aperto insuficiente das ligaduras em circunferência ou por transfixão, laceração do CAVO quando se rompe o ligamento suspensor, falha em ligar os grandes vasos no ligamento largo, laceração da artéria uterina como resultado da tração excessiva do corpo uterino e remoção prematura da pinça durante a ligadura. Além disso, pode ocorrer hemorragia persistente após a cirurgia em pacientes com distúrbios de coagulação não tratados ou não diagnosticados (Fingland e Sicard, 2008).

As fêmeas caninas com piómetra apresentam frequentemente disfunção renal sem anormalidades morfológicas associadas (Fingland e Sicard, 2008, Pretzer, 2008). Podem apresentar azotémia, oligúria ou anúria. Deve-se monitorizar a função renal e manter a hidratação após cirurgia. Recomenda-se diurese induzida por administração intravenosa de fluido cristalóide, durante no mínimo 24 a 36h após a cirurgia. A colocação de um cateter urinário auxilia na monitorização da produção de urina.

As cadelas com piómetra podem apresentar toxémia ou sépsis. Neste caso, deve-se administrar um antibiótico de amplo espectro durante a cirurgia e manter o mesmo após cirurgia, caso o animal apresente toxémia ou sépsis ou quando se deteta peritonite por ocasião da cirurgia (Fingland e Sicard, 2008).

### **3. Gonadectomia**

Nas fêmeas hermafroditas, para além da remoção de qualquer órgão do aparelho reprodutor feminino que esteja presente, deve ser realizada a gonadectomia. As gónadas contêm invariavelmente material testicular. Em alguns casos a remoção do material testicular pode causar redução no tamanho clitoridiano. Se o clitóris for efetivamente tapado pelos lábios da vulva, é necessária uma cirurgia reconstrutiva. Se o clitóris estiver exposto pode ficar mais vulnerável a traumatismos externos. Se for este o caso a remoção do clitóris, incluindo o osso torna-se necessária (Harvey, 2004). No caso dos machos o animal pode apresentar um prepúcio e um pénis subdesenvolvidos. Como já foi referido anteriormente pode haver hematúria e isso provocar atracção outros machos, o sangramento pró-estral é o resultado de tecido ovariano e uterino (Harvey, 2004).

As técnicas cirúrgicas que podem ser utilizadas são as seguintes:

#### **❖ Orquiectomia**

Nos cães, a orquiectomia pode ser realizada com a técnica aberta ou fechada. Na técnica aberta o folheto parietal da túnica vaginal parietal é incidido mas na técnica fechada não (Towle, 2012).

##### **a) Castração pré-escrotal aberta**

Posiciona-se o animal em decúbito dorsal e verifica-se a presença dos testículos na bolsa escrotal (Hedlund, 2008).

Realiza-se a tricotomia e assepsia da região pré-escrotal, evitando-se a irritação cutânea da região escrotal (Boothe, 2008)

Faz-se uma incisão na pele pré-escrotal enquanto que o testículo é empurrado em direção à incisão cutânea. Esta incisão é realizada ao longo da rafe medial, por cima do testículo. Esta é continuada através da fáscia espermática até no folheto parietal da túnica vaginal. Incide-se este folheto sobre o testículo, evitando-se a incisão da túnica albugínea e do folheto visceral da túnica para não expor o parênquima testicular (Towle, 2012).

Coloca-se uma pinça hemostática na ligação da túnica vaginal com o epidídimo, separando-se o ligamento da cauda do epidídimo da túnica (Boothe, 2008). Exterioriza-se o testículo com ajuda de uma tração caudal. Identificam-se as

estruturas do cordão espermático. Faz-se uma ligadura do plexo pampiniforme e ducto deferente com fio absorvível (2.0 ou 3.0) (Hedlund, 2008).

Coloca-se uma pinça hemostática no cordão vascular próximo ao testículo e com outra pinça segura-se o ducto deferente acima da ligadura. Assim faz-se a transecção do ducto deferente e do cordão vascular entre a pinça e a ligadura. Verifica-se existe hemorragia no cordão.

Circunda-se o músculo cremáster e a túnica com uma ligadura. Para remover o segundo testículo usa-se a mesma técnica.

A fáscia densa de cada lado do pênis aproxima-se com uma sutura descontínua ou contínua. O tecido subcutâneo fecha-se com uma sutura contínua. Aproxima-se a pele com uma sutura intradérmica subcuticular ou com pontos de pele isolados (Boothe, 2008).

#### **b) Castração pré-escrotal fechada**

Nesta técnica não se incide o folheto parietal da túnica vaginal. Alguns cirurgiões usam a técnica das três pinças com aplicação de uma ligadura circunferencial próxima à pinça de baixo (Towle, 2012). Esta ligadura ajuda na prevenção das hemorragias (Hedlund, 2008). Remove-se a pinça mais próxima do corpo do animal e faz-se outra ligadura circunferencial ou de transfixão, distal à primeira ligadura. A agulha tem que entrar na área não vascularizada da fáscia espermática. Corta-se o cordão espermático entre as pinças. Depois de se retirar as pinças deve-se verificar se existe alguma hemorragia. No segundo testículo usa-se a mesma técnica (Towle, 2012).

### **4. Amputação peniana**

Posiciona-se o animal em decúbito dorsal. A cavidade prepucial deve-se lavar bem com uma solução antisséptica. Prepara-se a região abdominal ventral e a região do períneo (Boothe, 2008). Cateteriza-se a uretra. Faz-se uma incisão elíptica desde a pele cranial de cada lado prepúcio com extensão apropriada à linha média perineal (Boothe, 2008, 2012). Com a ajuda de uma ligadura isola-se e envolve-se o pênis cranialmente ao escroto. Esta ligadura fica muito próxima do local de transecção inicial e deve ser uma ligadura muito forte (Boothe, 2008). É realizada a transecção e remoção do pênis. Exterioriza-se a porção proximal do pênis e remove-se a

ligadura temporária. Faz-se hemostasia definitiva e sutura-se a túnica albugínea na extremidade do pénis. A sutura da túnica albugínea é realizada com pontos simples e com fio não absorvível. A túnica albugínea é suturada com a extremidade do pénis sem incorporar a uretra (Boothe, 2012).

Faz-se uma uretostomia permanente nos cães se a uretra estiver a abrir no pénis. Nos casos de pénis redidual, sem uretra, tal não é necessário.

## **5. Amputação do clitóris**

Na amputação do clitóris a episiotomia pode ser necessária para expor o clitóris e a fossa de clitóris (Adin, 2012). Cateteriza-se o orifício uretral externo. A base de clitóris é dissecada junto com a fossa e as mucosas vestibular e vulvar. É necessário prestar atenção às hemorragias sobretudo nos animais com DSD porque estes podem sangrar profusamente. Suturam-se as margens seccionadas das membranas vulvar e vestibular. A sutura faz-se com fio monofilamento absorvível (Fingland e Sicard, 2008).

## **V. ESTUDO DOS CASOS CLINICOS**

### **A. Introdução e objectivos**

#### **1. Introdução**

O presente estudo foi realizado para investigar a intersexualidade canina e para perceber e relacionar a variedade de distúrbios intersexuais.

Na Medicina Veterinária esta área ainda não é muito desenvolvida. É muito importante para o diagnóstico correcto da intersexualidade canina, conhecer os tipos de DSD e classificá-los em três categorias: distúrbios nos cromossomas sexuais, distúrbios no desenvolvimento das gónadas e distúrbios do desenvolvimento sexual fenotípico.

Estes distúrbios podem ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento sexual (Poth et al., 2010).

#### **2. Objectivos**

No presente estudo, foram incluídos todos os animais atendidos durante o período de estágio curricular, no Hospital de FMV, e casos retrospectivos, com patologia compatível com intersexualidade canina. Os animais atendidos durante o estágio foram acompanhados durante a consulta, a cirurgia e no período de internamento.

Os objectivos do presente estudo foram:

- Avaliar e reconhecer, ao nível macroscópico que tipo de problema existia no aparelho reprodutor
- Classificar o tipo de DSD, no caso de ser possível
- Fazer um diagnóstico apropriado

### **B. Materiais e métodos**

#### **1. Amostra e Critérios de Inclusão**

A amostra do presente estudo é constituída por 5 casos.

Os primeiros três casos, são casos retrospectivos, e estão descritos em bibliografia (Mateus et al., 2005; Silva et al., 2009).

Os últimos dois casos (4 e 5) foram atendidos no Hospital de FMV durante o estágio. Os animais tinham idades entre 7 meses e 12 anos. Eram considerados animais saudáveis sem nenhuma doença detectável.

Do número total de casos, todos foram submetidos a cirurgia.

No presente estudo foram incluídos todos os animais que apresentavam suspeita de DSD.

## **2. Técnicas envolvidas no diagnóstico**

### **2.1. OVH**

No presente estudo, em todos os casos foi feita a OVH pela linha média ventral, como descrita na revisão bibliográfica.

### **2.2. Exame histopatológico**

Antes e durante a cirurgia os aparelhos reprodutivos foram observados macroscopicamente, para registrar as alterações. Depois da cirurgia, diferentes estruturas dos aparelhos reprodutivos (útero, gônadas) foram submetidas a exame histológico. As peças que foram observadas histologicamente foram fixadas em formol a 10% neutro tamponado, incluídas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina.

### **2.3 Análise citogenética - bandeamento clássico G**

Os cromossomos não tem estrutura uniforme ao longo de todo o seu comprimento e cada par cromossômico apresenta um padrão distinto e bem característico de bandas.

Assim sendo, os cromossomos são desproteinizados por ação da tripsina e, posteriormente, são corados com o método de Giemsa (de onde deriva o nome bandas G). Os cromossomos mostram um padrão de bandas claras (Bandas G negativas) e escuras (Bandas G positivas), no qual as faixas escuras correspondem ao ADN rico em bases AT e contêm poucos genes ativos; as bandas G claras têm ADN rico em bases GC e apresentam muitos genes ativos.

A análise citogenética por bandeamento clássico G ajuda identificar alterações cromossômicas, permitindo detectar pequenas variações estruturais, como inversões, translocações, e localizar a região do cromossoma diretamente afetada. Assim pode-se compreender a evolução cariotípica entre as espécies.

## **C. Resultados**

### **1. Caso 1**

O primeiro caso refere-se a um cão de raça Basset Hound, com 2 anos de idade que tinha o sexo fenotípico feminino e fez a cirurgia de ovariectomia, dois meses após o cio.

Na observação macroscópica da genitália externa observou-se a hipertrofia do clitóris (Figura 1).

Na observação macroscópica e histológica dos órgãos genitais internos (Figura 2) notou-se que o animal tinha o útero bem diferenciado e de morfologia normal, compreendendo também o cérvix. As gónadas estavam situadas perto das extremidades craniais dos cornos uterinos. A análise histopatológica do útero (Figura 5) confirmou a existência de uma estrutura normal, com endométrio em involução. As gónadas (Figura 3) eram constituídas na sua maior parte por de tubos seminíferos hipoplásicos, organizados em lóbulos, e constituídos apenas por células de Sertoli (Figura 4 A, B, D). O tecido intersticial continha células de Leydig. Na área cortical da gónada foram encontrados folículos em diferentes estádios, alguns dos quais antrais, e corpos lúteos em regressão. Algumas das estruturas foliculares apresentavam sinais de atresia. Observou-se um folículo com dois oócitos. Observou-se um epidídimo rudimentar observou-se adjacente a uma das gónadas. A coexistência de tecido gonadal com arranjo testicular e ovárico permitiu a classificação das gónadas como ovotestis.

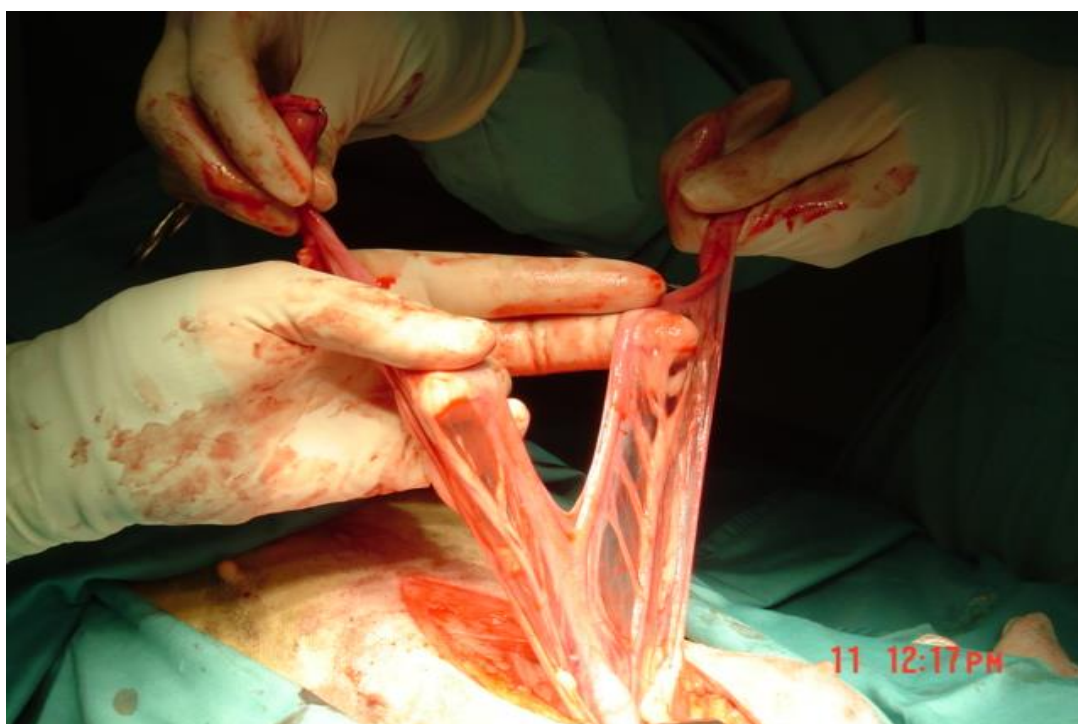
A análise citogenética foi feita por bandeamento clássico G e relevou que o cariótipo tinha o padrão XX. Os estudos moleculares relevaram que a pesquisa do gene SRY foi negativa e do gene SOX9 foi positiva.



**Figura 1. Hipertrofia de clitoris-caso 1**



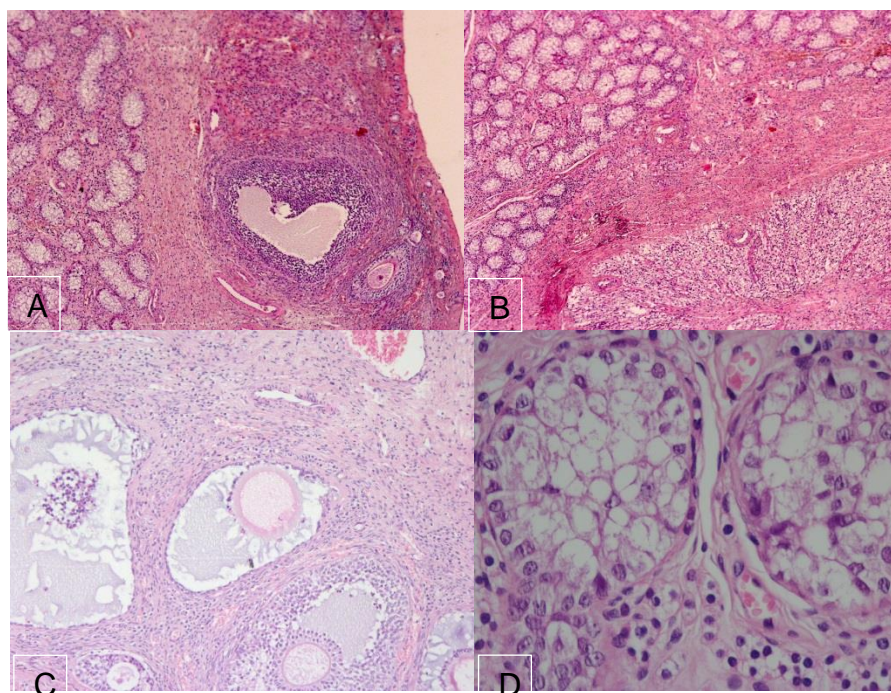
**Figura 2. Útero - aspecto macroscópico-caso 1**



**Figura 3. Gónadas- aspecto macroscópico-caso 1**



**Figura 4. Aspecto microscópico-caso 1**



A - ovotestis (direita - estruturas ováricas; esquerda - componente testicular)

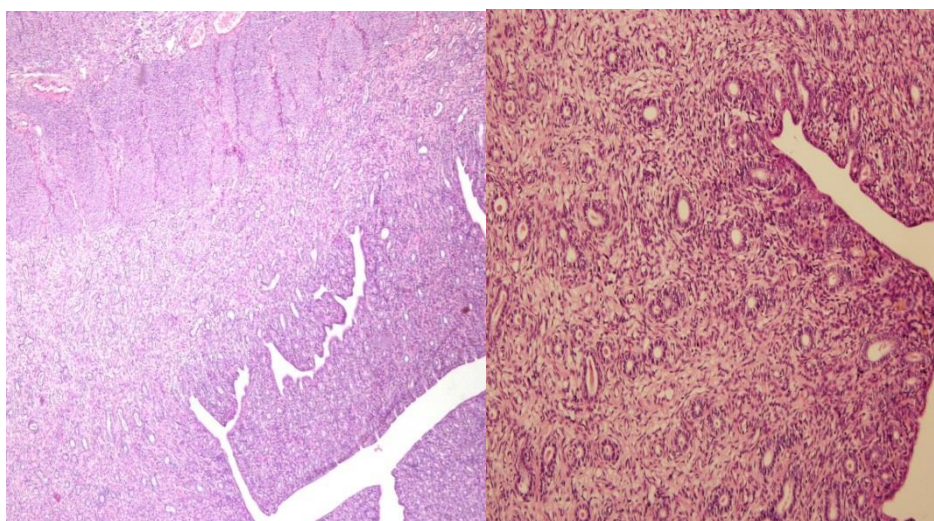
B - ovotestis (em cima - tubos seminíferos; em baixo – corpo lúteo)

C - folículos ováricos (alguns em atresia)

D - tubos seminíferos hipoplásicos



**Figura 5. Útero- aspecto microscópico-caso 1**



## **2. Caso 2**

O segundo caso corresponde a um cão de raça Basset Hound, com 7 meses de idade que tinha o sexo fenotípico feminino e fez a cirurgia de ovariectomia, sem que o animal tivesse sido visto em cio.

Na observação macroscópica da genitália externa detectou-se a hipertrofia do clitóris (Figura 6).

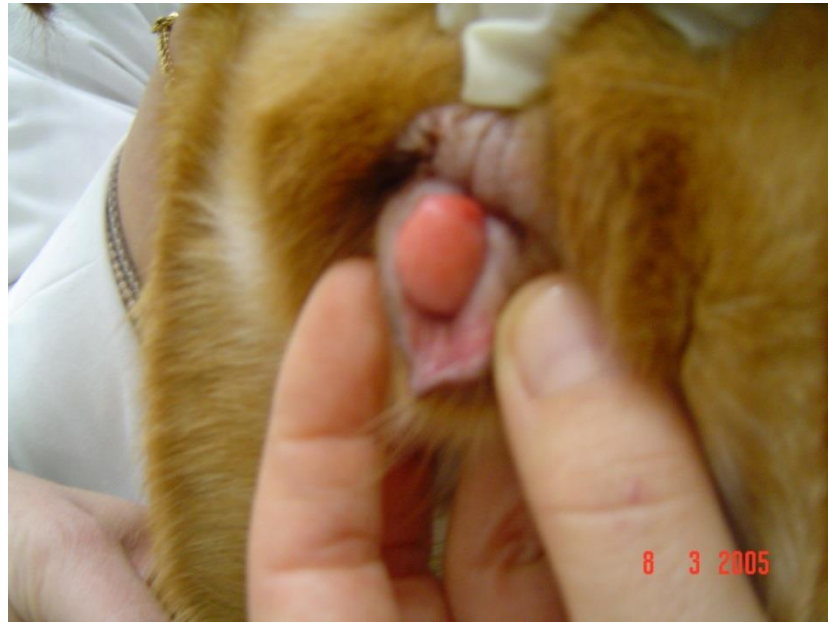
Na observação macroscópica e histológica dos órgãos genitais internos notou-se que o animal tinha o útero bem diferenciado.

No exame histopatológico o endométrio apresentava algumas glândulas (impúbere) (Figura 9). Notou-se extensas hemorragias na lâmina própria que por vezes se detectaram no lúmen uterino.

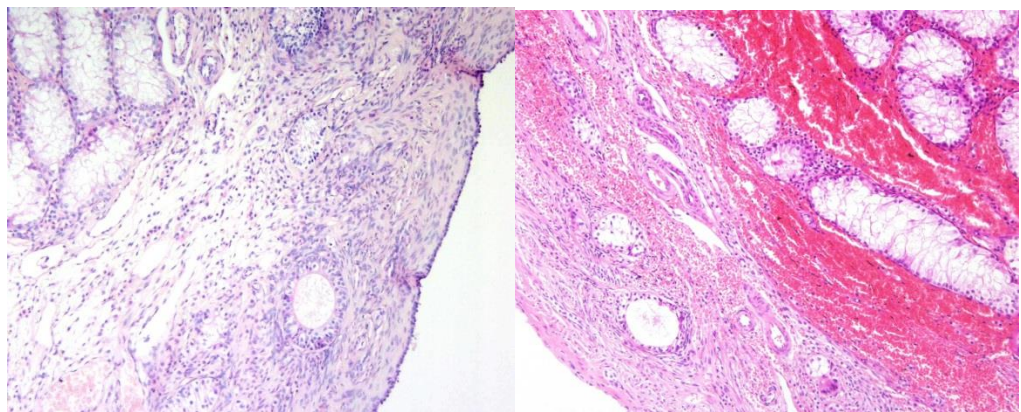
As gónadas estavam situadas perto das extremidades craniais dos cornos uterinos. Numa das gónadas observou-se uma glândula intersticial muito evidente. A cada gónada era anexado um epidídimo (Figura 8) rudimentar. O exame microscópico das gónadas revelou a presença de estruturas testiculares e ováricas, correspondendo estas gónadas a ovotestis (Figura 7).

A análise citogenética, foi feita por bandeamento clássico G e relevou-se que o cariótipo tinha o padrão XX. Os estudos moleculares relevaram que a pesquisa do gene SRY foi negativa e do gene SOX9 foi positiva.

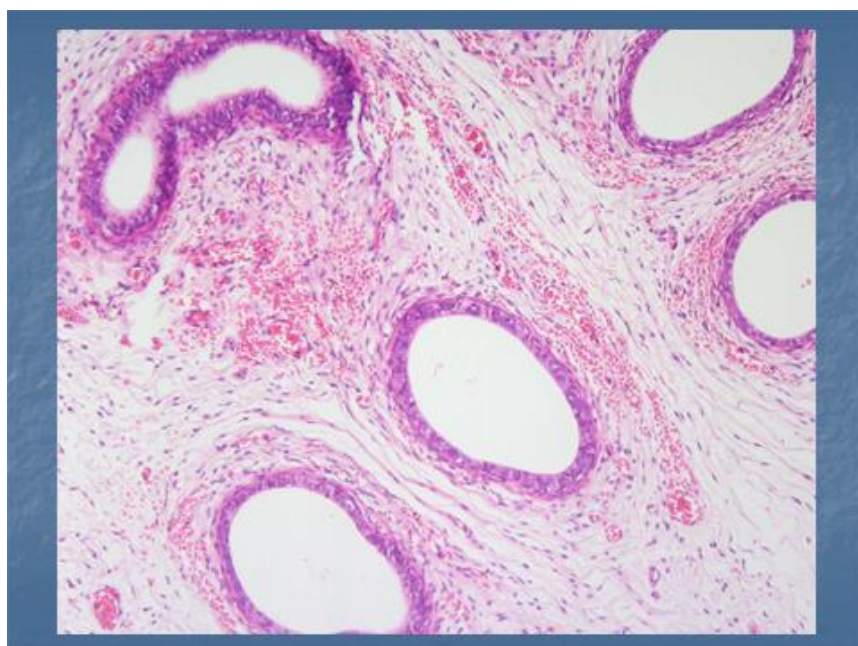
**Figura 6. Hipertrofia de clítoris-caso 2**



**Figura 7. Gónadas- aspecto microscópico-caso 2**

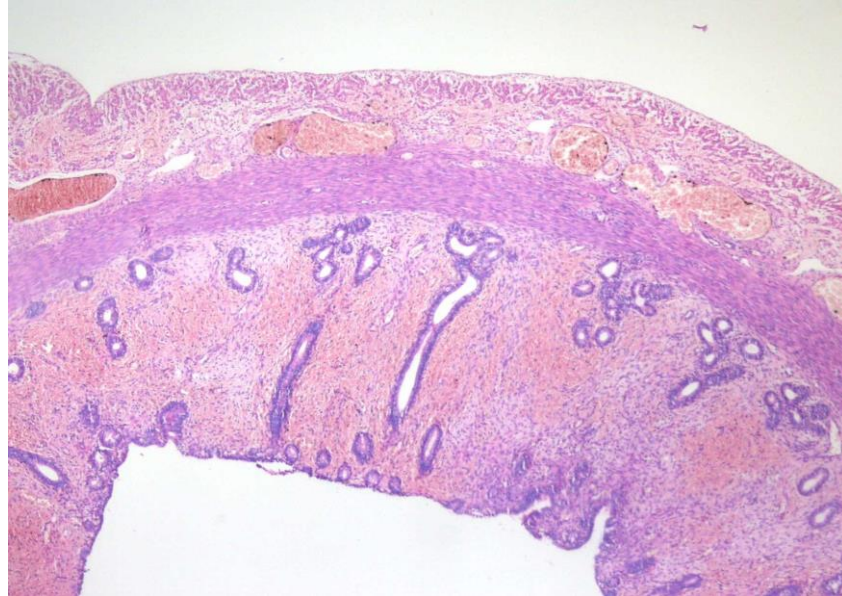


**Figura 8. Epidídimo-aspecto microscópico-caso 2**





**Figura 9. Útero-aspecto microscópico-caso 2**



### **3. Caso 3**

O terceiro caso diz respeito a um cão de raça Cocker, com 12 anos de idade que tinha o sexo fenotípico feminino e fez a cirurgia de ovariectomia e a exérese cirúrgica de um tumor mamário e de parte da cadeia mamária esquerda (de 3E a 5E).

Na observação macroscópica dos genitais exteriores observou-se a hipertrofia de clitóris (Figura 10).

Na observação macroscópica e histológica dos órgãos genitais internos observou-se o útero não apresentava alterações aparentes (Figura 15) e que ambas as gónadas estavam envolvidas por uma bolsa ovárica. Notava-se também uma estrutura anexa que era semelhante a um plexo pampiniforme fora da bolsa ovárica. A gónada maior tinha três estruturas nodulares. De ponto de vista histológica as gónadas tinham morfologia compatível com ovotestis. O epitélio da superfície de uma das gónadas apresentava hiperplasia papilar e um pequeno adenoma papilífero (Figura 11 B). Observou-se também os três corpos amarelos (Figura 11 A e C) e algum tecido ovárico (Figura 11 D) e tubos semíniferos hipoplásicos, constituídos por células Sertoli (Figura 12 e 13) e células Leydig no interstício (Figura 13).

A gónada contralateral era constituída por tubos seminíferos com áreas hipoplásicas, onde a presença das células Leydig era maior (Figura 14). Nas duas gónadas notou-se um plexo vascular e o infundíbulo de uma trompa uterina.

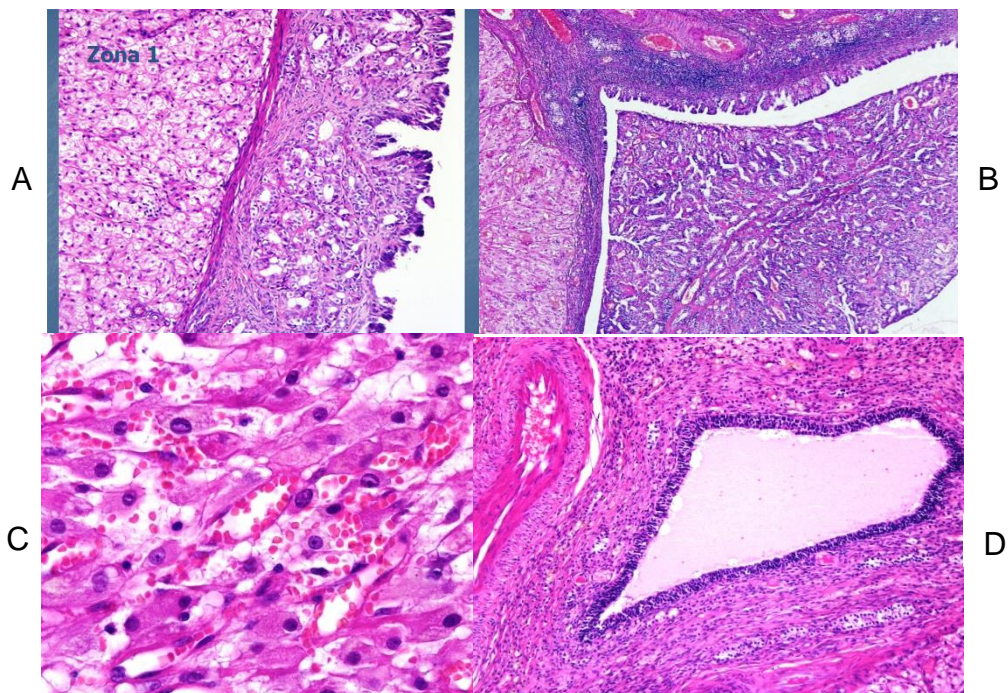
No útero observou-se que o endométrio tinha características consoante a fase de proestro ou início de estro e apresentava hiperplasia quística do endométrio em fase inicial (Figura 15).

Embora sem análise citogenética e com base nas características do trato reprodutivo, pode-se afirmar que o indivíduo era uma hermafrodita verdadeiro albergando dois ovotestis (bilateral).

**Figura 10. Hipertrofia de clitóris - caso 3**



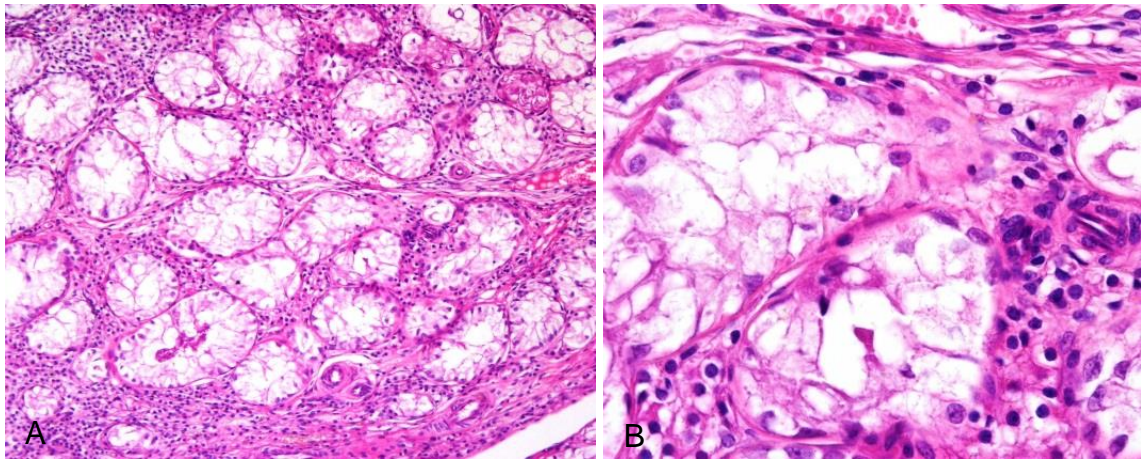
**Figura 11. Gónada 1 - exame microscópico - caso 3**



- A - corpo lúteo em actividade
- B - adenoma papilífera da superfície do ovário
- C - maior ampliação do corpo lúteo
- D - folículo antral atrésico

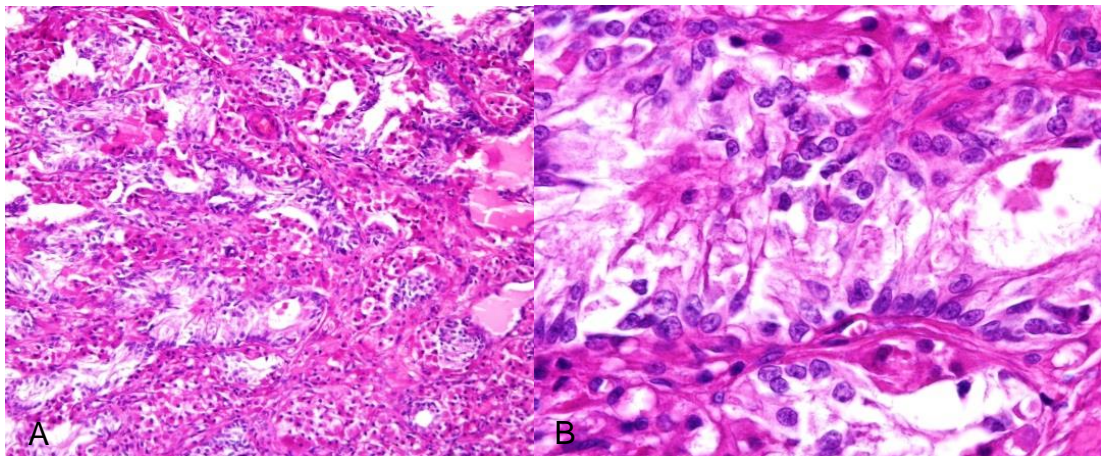


**Figura 12. Gónada 1 - exame microscópico - caso 3**



A – tubos seminíferos hipoplásicos  
B – maior ampliação dos tubos seminíferos

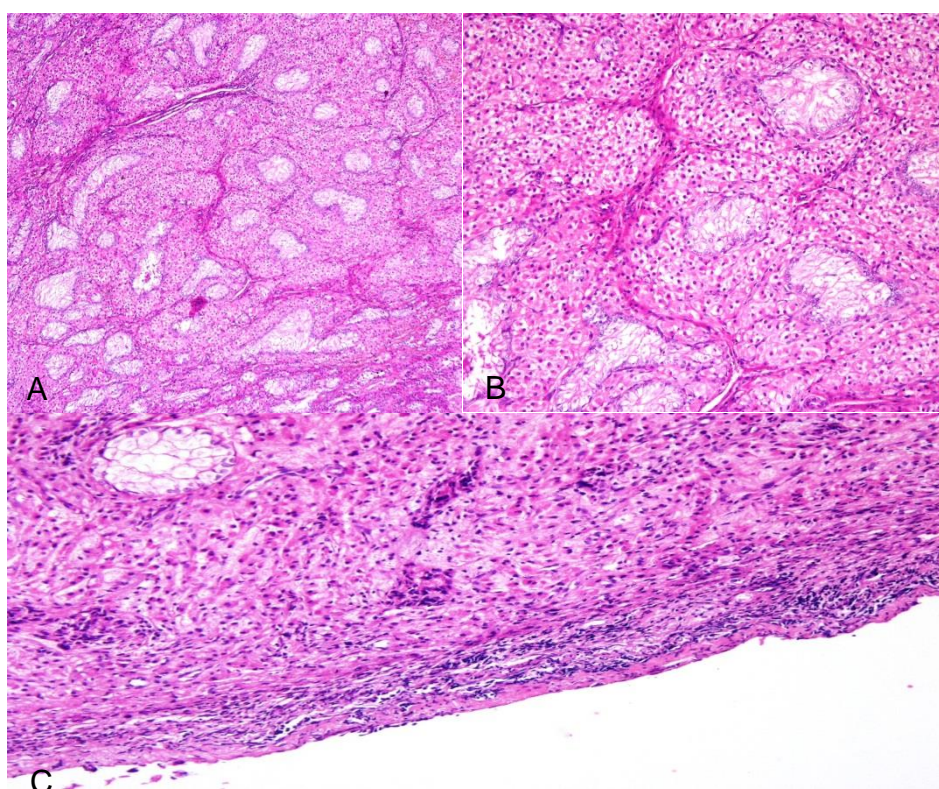
**Figura 13. Gónada 1 - exame microscópico - caso 3**



A – tubos seminíferos hipoplásicos rodeados por numerosas células de Leydig  
B – maior ampliação de A

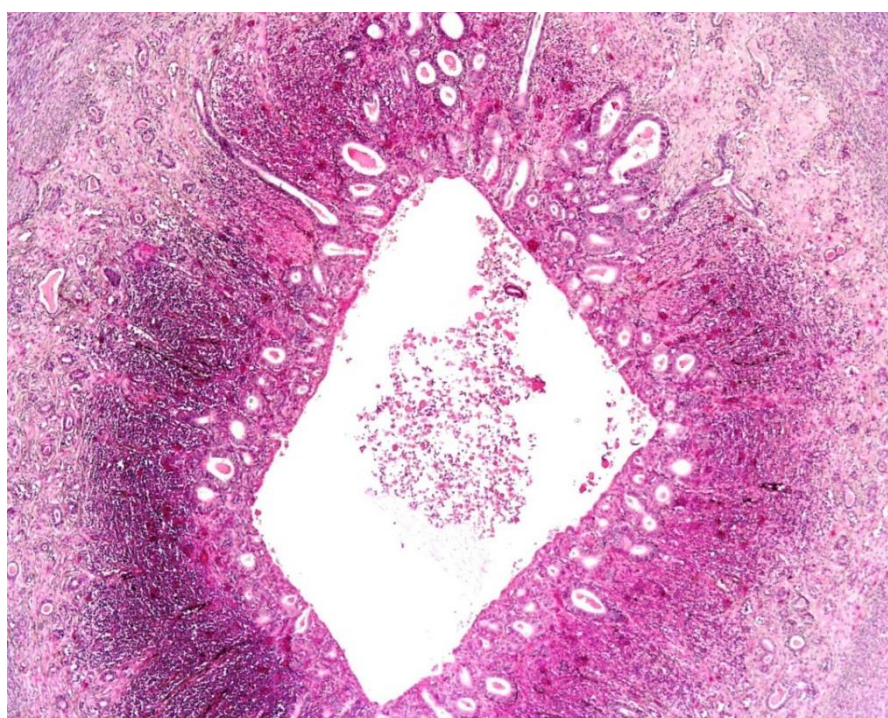


**Figura 14. Gónada 2 - exame microscópico - caso 3**



- A – tubos seminíferos hipoplásicos  
B – maior ampliação; aumento relativo das células de Leydig  
C – superfície da gónada

**Figura 15. Útero-aspecto microscópico-caso 3**





#### 4. Caso 4

O quarto caso acompanhado durante o período de estágio, é relativo a um cão de raça Bichon, com 5 anos de idade que tinha a genitália externa ambígua (Figura 16 e 20) e fez a cirurgia de ovariectomia e amputação (ressecção) do pénis.

Na observação macroscópica dos órgãos genitais exteriores observou-se o pénis, semi-exteriorizado na vulva, e sem prepúcio, continha um osso peniano.

Na observação macroscópica e histológica dos órgãos genitais internos (Figura 19), observou-se que uma das gónadas era um testículo (Figura 17) com hipoplasia dos tubos seminíferos, que eram constituídos por células de Sertoli, notando-se algumas espermatogónias. Havia ausência total de espermatogénese. Notava-se uma variação nos diâmetros dos perfis destes tubos. Notou-se que a hipoplasia dos tubos seminíferos deu lugar a uma pseudo-hiperplasia das células de Leydig.

O testículo tinha a túnica albugínea espessa. Anexo ao testículo notava-se um epidídimo de lúmen ligeiramente dilatado, que encerrava material homogéneo eosinofílico. A mucosa, a muscular e a serosa tinham aspecto normal. A serosa e a muscular são comuns ao corno uterino ipsilateral. Notou-se também anexos ao testículo, um plexo pampiniforme. O endométrio era fino e as glândulas eram muito rudimentares. A lâmina própria estava infiltrada por células mononucleadas, essencialmente linfócitos. As células epiteliais do endométrio estavam hipertrofiadas em alguns locais, e de citoplasma claro e vacuolizado, aspecto sugestivo de estimulação por progesterona.

A gónada contralateral (Figura 18) era também um testículo hipoplásico, com o epidídimo anexo e tinha as características semelhantes às da outra gónada.

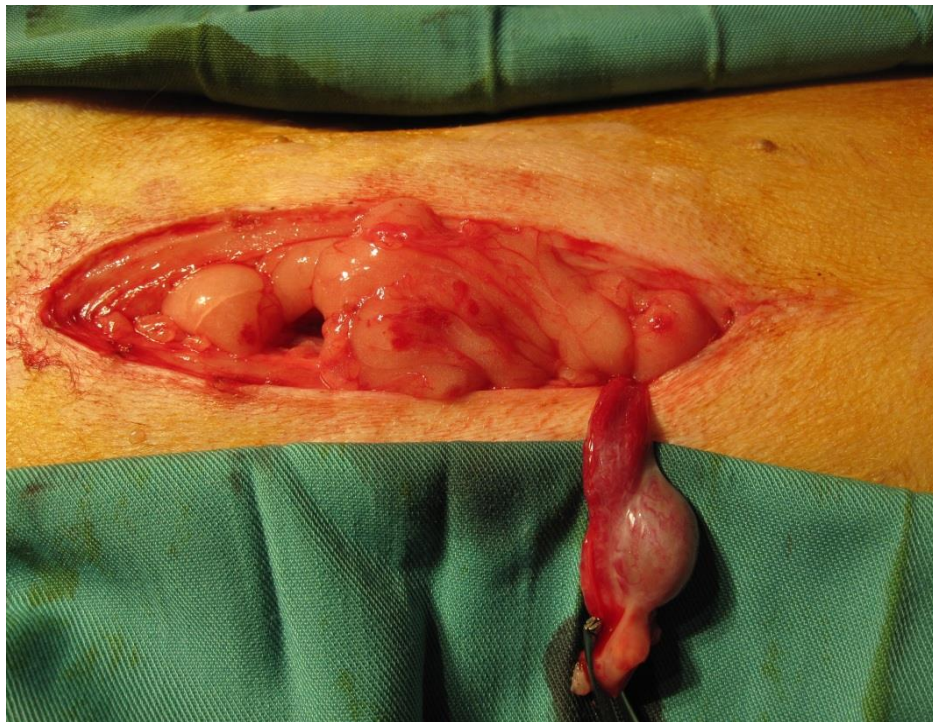
Foram observados também um útero normalmente desenvolvido e ductos deferentes anexos aos testículos (Figura 19).

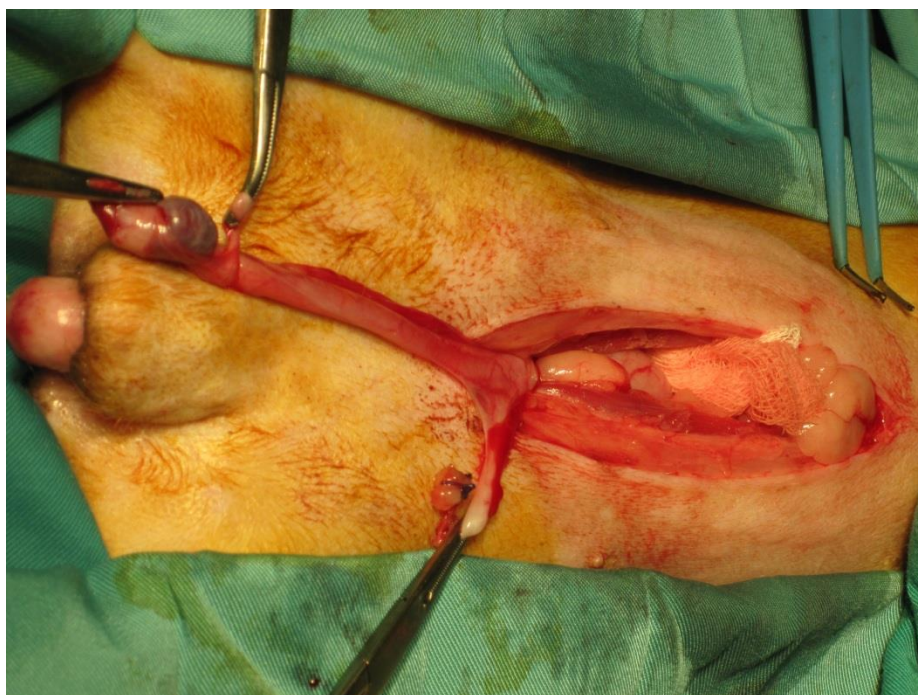
Sem análise citogenética e com as características do trato reprodutivo, podemos afirmar que o indivíduo era um pseudo hermafrodita masculino.

**Figura 16. Exteriorização do pênis - caso 4**



**Figura 17. Gónada esquerda - caso 4**





**Figura 18. Gónada direita - caso 4**



**Figura 19. O aspecto macroscópico dos órgãos genitais internos - caso 4**





**Figura 20.O pénis - caso 4**

## **5. Caso 5**

O quinto caso foi relativo a um cão de raça Yorkshire Terrier, acompanhado durante o período de estágio, com 3 anos de idade que tinha o sexo fenotípico feminino e fez a cirurgia de ovariectomia e amputação (ressecção) do pénis.

Na observação macroscópica dos órgãos genitais externos, observou-se que tinha o pénis semi-exteriorizado na vulva (Figura 21).

Na observação macroscópica e histológica dos órgãos genitais internos observou-se que as gónadas (Figura 22) eram formadas por epidídimo bem diferenciado e completo, o qual recobria a estrutura correspondente ao testículo. Neste evidenciaram-se tubos revestidos, por células de Sertoli, totalmente envolvidas por células intersticiais. Estas tinham aparentemente as características morfológicas próprias das células de Leydig. A estrutura testicular observada encontrava-se ainda rodeada por tubos com revestimento epitelial ciliado. Estes tubos não pertenciam à estrutura testicular, podendo ser equiparáveis às trompas.

Em relação ao útero (Figura 23), observou-se que apresentava constituição histológica normal, e que o endométrio era formado por glândulas envolvidas por um

estroma bem desenvolvido, com abundância celular. A área correspondem ao miométrio, parecia descontínua.

Ambas as gónadas eram de natureza testicular.

Sem análise citogenética e com as características do trato reprodutivo, podemos afirmar que o indivíduo era um pseudo-hermafrodita, porque havia gónadas testiculares em conjugação com tracto reprodutor feminino e genitália externa ambígua (vulva e pénis hipoplásico – Figura 21 e 24).

**Figura 21. Exteriorização do pénis**



**Figura 22. As gónadas durante a cirurgia - caso 5**





**Figura 23. O aspecto macroscópico dos órgãos genitais internos - caso 5**



**Figura 24. O pênis e os órgãos genitais internos femininos - caso 5**



### **D. Discussão**

Os parâmetros mais importantes para o diagnóstico provável do primeiro caso são:

- O sexo fenotípico feminino
- Hipertrofia do clitóris
- No exame microscópico das gónadas observou-se presença simultânea de estruturas testiculares e ováricas, correspondendo aquelas a ovotestis
- Actividade de gene SRY negativa e do SOX9 positiva
- Cariótipo XX

Os parâmetros mais importantes para o diagnóstico do segundo caso são:

- O sexo fenotípico feminino
- Hipertrofia do clitóris

- No exame microscópico a cada gónada estava anexado um epididimo rudimentar, e cada um encerrava estruturas testiculares e ováricas (ovotestis)
- Cariótipo XX
- Actividade de gene SRY negativa e do SOX9 positiva

Os parâmetros mais importantes para o diagnóstico do terceiro caso são:

- O sexo fenotípico feminino
- Hipertrofia de clitóris
- As gónadas tinham morfologia de ovotestis

Estes três casos, têm órgãos genitais externos femininos, têm ovotestis e dois deles têm a confirmação por análise citogenética (bandeamento clássico G) que o cariótipo tinha o padrão XX. Podemos afirmar que estes três casos têm distúrbios do desenvolvimento gonadal, e do desenvolvimento fenotípico. Estes três casos correspondem a hermafroditismo verdadeiro ou DSD ovotesticular, sendo XX em dois casos (Poth et al.,2010).

No caso 4,os parâmetros para o diagnóstico provável são:

- O sexo fenotípico é feminino
- O pénis (com osso peniano) é semi-exteriorizados na vulva
- Ambas as gónadas são testiculares, com tubos seminíferos hipoplásicos
- Os órgãos genitais externos são ambíguos (vulva e pénis hipoplásico)

O caso assemelha-se ao síndrome de persistência dos ductos de Muller, mas difere deste porque os órgãos genitais externos eram feminizadas. Estava aconselhado fazer o exame molecular dos factores implicados na diferenciação sexual, como o SRY, SOX9 e Dax-1.

No caso 5, os parâmetros para o diagnóstico provável são:

- O sexo fenotípico é feminino
- O pénis é semi-exteriorizado na vulva
- A correspondência a testículos
- As gonadas masculinas são associadas aos órgãos genitais externos ambíguos

Os casos 4 e 5, são pseudo-hermafroditas masculinos, como foi mencionado no resultado do exame anatomo-patológico, porque os testículos estão presentes, mas há presença de útero e de vulva.

Nos ultimos dois casos (4 e 5) não foi possível realizar nenhum exame complementar, como por exemplo a análise citogenética, assim não se pode aplicar a classificação de Poth et al.

### **E. Conclusão**

No presente estudo tentou-se analisar com profundidade a realidade clínica de situações de intersexualidade canina, tentando-se focar a sua complexidade do diagnóstico neste estudo.

Foram conseguidos os objectivos propostos para o estudo de casos, no que diz respeito a avaliar o tipo de problema existente no aparelho reprodutor, em cada tipo de DSD.

Podem ser realizados futuros estudos, onde se propõe que o diagnóstico da intersexualidade canina deve ser realizado de seguinte maneira:

- ❖ Exame físico, análise das hormonas sexuais (são úteis também os métodos imagiológicos como a ecografia)
- ❖ Fazer uma análise patomorfológica extensiva e uma análise citogenética para determinar respectivamente o sexo fenotípico e o sexo cromossómico.
- ❖ Adicionalmente, deve ser realizada uma análise do pedigree para revelar se há distúrbios hereditários e para excluir da reprodução pais e irmãos de arvores genealógicas que sugiram transmissão hereditária de um tipo de DSD.

A DSD, normalmente não é uma patologia ameaça a vida do animal. Sendo assim, o diagnóstico é influenciado pela capacidade económica dos proprietários ou a sua vontade de ter um diagnóstico definitivo. Neste sentido, é muito importante informar os proprietários que a DSD pode ser hereditária, e aconselhá-los para não fazer criação com estes animais.

Conclui-se que o presente estudo contribui na divulgação e descrição de 5 casos, 3 hermafroditas verdadeiros e 2 pseudo-hermafroditas masculinos, proporcionando esclarecimentos sobre um assunto que ainda é carente de estudos e publicações.



## VI. Bibliografia

Adin, C.A. (2012). Vagina, Vestibule and Vulva, In Tobias, K.M., Johnston, S.A., *Veterinary Surgery Small Animal*. Volume 2. Saunders. Elsevier

Aspinall, V., O'Reilly, M. (2004). Reproductive System In Aspinall, V., Cappello, M., *Introduction to Veterinary Anatomy and Pshysiology*, (1<sup>a</sup>ed.). Butterworth-Heinemann Ed.

Baumans, U. (1982). *Regulation of testicular descent in the dog*, Thesis, Utrecht, The Netherlands, Rijksuniv.

Baumans, U., Dijkstra, G., Wensing, C.J.G. (1983). The role of nonandrogenic testicular factor in the process of testicular descent in the dog, *International Journal of Andrology* 6:541–552,

Bigliardi, E., Parma, P., Peressotti, P., Lorenzi, L., Wohlsein, P., Passeri, B, Jottini, S., Cantoni, A.M. (2011). Clinical, genetic, and pathological features of male pseudohermaphroditism in dog. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9:12. BioMed Central.

Boothe, H.W. (2008). Cirurgia de Testículos e Escroto, Cirurgia de Pênis e Prepúcio In Birchard, S.J., Sherding, R.G., *Saunders Manual Saunders de clínica de pequenos animais*. Editora Roca LTDA. – São Paulo

Boothe, H.W. (2012). Penis and Prepuce In Tobias, K.M., Johnston, S.A., *Veterinary Surgery Small Animal*. Volume 2. Saunders. Elsevier

Camerino, G., Parma, P., Radi, O., Valentini, S. (2006). Sex determination and sex reversal. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16:289–292. Elsevier

Chaffaux, S., Mailhac, J.M., Cribiu, E.P., Popescu, C.P., Cotard, J.P. (1980). L'intersexualité chez le chien (canis familiaris). A propos de quatre cas. *Recueil de Médecine. Vétérinaire* 156, 179–192.

Cotinot, C., Pailhoux, E., Jaubert, F., Fellous, M. (2002). Molecular Genetics of Sex Determination. *Seminars in Reproductive Medicine*/20 (3):pp.

Dyce, K.M. (2010). Órgãos Reprodutivos Masculinos In Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G., *Tratado de Anatomia Veterinária* (pp203–215). London: Elsevier Editora Ltda.

Dyce, K.M. (2010). Órgãos Reprodutivos Femininos In Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G., *Tratado de Anatomia Veterinária* (pp215–235). London: Elsevier Editora Ltda.

Dyce, K.M. (2010). A Pelve e os Órgãos Reprodutivos de Cães e Gatos. In Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G., *Tratado de Anatomia Veterinária* (p473). London: Elsevier Editora Ltda.

Egenvall, A., Hagman, R., Bonnett, B.N., Hedhammar Å., Olson, P., & Lagerstedt, A. S. (2001). Breed Risk of Pyometra in Insured Dogs in Sweden. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(6), 530-538.

Evans, H.E., de Lahunta, A. (2013). The Urogenital System In Evans, H.E., de Lahunta, A., *Miller's anatomy of the dog*. (4<sup>a</sup> ed.). Saunders Elsevier.

Feldman, E.C., Nelson, R.W. (2007). *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3rd Edition. Saunders. Elsevier

Fingland, R.B., Sicard, G.K. (2008). Cirurgia de Ovários e Útero, Cirurgia de vagina e Vulva In Birchard, S.J., Sherding, R.G., *Saunders Manual Saunders de clínica de pequenos animais*. Editora Roca LTDA. – São Paulo

Frasson, B.A. (2012). Ovaries and Uterus In Tobias, K.M., Johnston, S.A., *Veterinary Surgery Small Animal. Volume 2*. Saunders. Elsevier

Fukuda, S. (2001). Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. *Experimental Animals*, 50(4), 325-329.

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Wessler, S.R., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. (2004). *Introduction to genetic analysis*. (8<sup>th</sup> ed.). W.H. Freeman & Company

Hare, W.C.D. (1976). Intersexuality in the dog. *The Canadian Veterinary Journal*, Vol. 17, no. 1

Harvey, M. (2004). Conditions of the Non-Pregnant Female In Simpson, G.M., England, G.C.W., Harvey, M., *BSAVA Manual of small animal reproduction and Neonatology*. Ed: British Small Animal Veterinary Association

Hartwell, L.M., Hood, L., Goldberg, M.L., Reynolds, A.E., Silver L.M., (2011). *Genetics: from genes to genomes*, (4 ed.). McGraw-Hill Higher Education.

Hedlund, C.S. (2008). Cirurgia dos Sistemas reprodutivo e Genital. In Fossum, T.W., *Cirurgia de pequenos animais*. (tradução da 3<sup>a</sup> edição). Elsevier Editora Ltda – Brasil

Hughes, A. (2008). Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. Vol. 22, No. 1, pp. 119–134. Elsevier

Kelly, D.F., Long, S.E., Strohmenger, G.D. (1976). Testicular neoplasia in an intersex dog. *Journal of Small Animal Practice*. 17, 247–253

Kim, K.S., Kim, O. (2006). A hermaphrodite dog with bilateral ovotestes and pyometra. *Journal of Veterinary Science*. 7(1), 87–88

Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A. (2012). *Concepts of genetics*. (10<sup>a</sup> ed.). Pearson Ed.

Kobayashi, A., Behringer, R.R. (2003). Developmental Genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature reviews. Genetics*. 4 (12):969-80

Kothapalli, K., Kirkness, E., Pujar, S., Wormen, R.V., Meyers, W.V.N. (2005). Exclusion of Candidate Genes for Canine SRY-Negative XX Sex Reversal. *Journal of Heredity*, 96(7):759–763

- Lauber, A.B. (2010). Control of sex development. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 24, 163–186. Elsevier
- Lyle, S.K. (2007). Disorders of sexual development in the dog and cat. *Theriogenology* 68, 338–343. Elsevier
- Manuylov, N.L., Zhou, B., Ma, Q., Fox, S.C., Pu, W.T., Tevosian S.G. (2011). Conditional ablation of Gata4 and Fog2 genes in mice reveals their distinct roles in mammalian sexual differentiation. *Developmental Biology* 353, 229–241.
- Marshall, L.S., Oehlert, M.L., Haskins, M.E., Selden, J.R., Patterson, D.F. (1982). Persistent mullerian duct syndrome in miniature schnauzers. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 1982;181:798–801.
- Mateus, L., Carreira, M., Silva, J.F., Silva, R., Adegas, F., Guedes-Pinto, H.,Chaves, R. (2005). Dois casos de hermafroditismo bilateral em Basset Hound, In *Livro de resumos do Congresso Ciências Veterinárias 2005*, Estação zootécnica Nacional, 13,14,15 Outubro 2005
- Mateus, L., Eilts, B.E, (2010). Cystic Endometrial Hiperplasia and Pyometra In Ettinger, S.J., Feldman, E.C., *Textbook of veterinary internal medicine*. (7ª ed., Vol. 2). Saunders Elsevier.
- McGeady, T.A., Quinn, P.J., FitzPatrick, E.S., Ryan, M.T. (2006). *Veterinary Embryology*. Ed. Blackwell.
- Meyers-Wallen, V.N. (1993). Genetics of sexual differentiation and anomalies in dogs and cats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47 (Suppl), 441-452.
- Meyers-Wallen, V.N., Patterson, D.F. (1986). Disorders of sexual development in the dog. In: Morrow, D.A. (Ed.), *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals*, second ed. WB Saunders, pp. 567–574.

Nicholas, F. W. (2010). *Introduction to veterinary genetics*. (3<sup>a</sup>ed.). Ed. Wiley Blackwell

Nickel, R.F., Ubbink, G., Van der Gaag, I., Van Sluijs, F.J. (1992). Persistent Müllerian duct syndrome in the Basset Hound. *Tijdschr. Diergeneeskde*. 117 (Suppl. 1), 31S.

Pasquini, C.J., Spurgeon, T., (1992). Female and Male Reproductive System In Pasquini, C.J., Spurgeon, T., *Anatomy of domestic animals: systemic and regional approach* (5th ed). Sudz Publishing, Pilot Point, Texas

Pierce, B. A. (2012). *Genetics: A conceptual approach*. (4<sup>a</sup>ed.). Ed. W.H. Freeman and Company

Phemister, R.D. (1974). Nonreurogenic reproductive failure in the bitch, *The Veterinary Clinics of North America*, 4:573-86.

Poth, T., Breuer, W., Walter, B., Hecht, W., Hermanns, W. (2010). Disorders of sex development in the dog-Adoption of a new nomenclature and reclassification of reported cases. *Animal Reproduction Science* 121, 197–207.

Predoi, G., Belu, C. (2001). *Anatomia animalelor domestice*, (1<sup>a</sup>ed.). Ed. Bic All

Pretzer, S.D. (2008). Canine embryonic and fetal development: A review *Theriogenology* 70, 300–30.

Silva, J.F., Antunes, W., Pinho, M., Correia, J.J., Peleteiro, M.C. (2009). Um caso de carcinoma mamário em cão hermafrodita verdadeiro (Canis familiares), *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 104(569-572), 95-96pag

Silversides, D.W., Pilon, N., Behdjani, R., Boyer, A., Daneau, I., Lussier, J. (2001). Genetic manipulation of sex determination and phenotype in domestical animals. *Theriogenology* 55, 51–63.

Simpson, G., England, G., Harvey, M. (1998). *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. Iowa State University Press, Ames. Ed: British Small Animal Veterinary Association

Sinowatz, F. (2010). Development of the urogenital system In Hyttel, P., Sinowatz F., Vejlsted M., *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Ed. Saunders Elsevier.

Smith, F. O. (2006). Canine pyometra. *Theriogenology*, 66(3), 610-61

Songsasen, N., Wildt, D.E. (2007). Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation system in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*, v.98, p.2-22

Stone, E.A., (2003). Reproductive System In Slatter, D.H., *Textbook of small animal surgery*. (3<sup>rd</sup>ed.). Saunders Elsevier.

Svendsen, C.K., Thomsen, P.D., Basse, A. (1985). Two cases of male pseudohermaphroditism in the dog. Clinical, macroscopic, karyotypic, and therapeutic features. *Nordisk Veterinaermedicin*. 37, 358–363

Swain A., Badge R. L. (1999). Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & Development*. 13: 755 – 767.

Towle, H.A. (2012). Testes and Scrotum In Tobias, K.M., Johnston, S.A., *Veterinary Surgery Small Animal*. Volume 2.Sauders. Elsevier

Vaiman, D., Pailhoux, E. (2000). Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *Trends In Genetics* 2000, 16 (11):488-94

Veitia, A.R. , Laura, S.C., Ottolenghi, C., Pailhoux, E., Cotinot, C., Fellous, M. (2001). Testis determination in mammals: more questions than answers. *Molecular and Cellular Endocrinology* 179, 3–16.

Volpe, P., Izzo, B., Pia Di Meo, G., Perucatti, A., Iannuzzi, L. (2000). Male pseudohermaphroditism in a dog: a clinical case. *The Veterinary Record*. 146, 532–533.

Wallen, V.N.M. (2006). Genetics, genomics, and molecular biology of sex. *Theriogenology* 66, 1655 –1658.